

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Mariane Roman

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DE UM ANÁLOGO
LIPOFÍLICO DA ISONIAZIDA, DENOMINADO JVA,
ADMINISTRADO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr Anicleto Poli

Co-orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis
2012

Catalogação na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

R758e Roman, Mariane

Estudo farmacocinético de um análogo lipofílico da isoniazida, denominado JVA, administrado em camundongos [dissertação] / Mariane Roman ; orientador, Anicleto Poli. – Florianópolis, SC, 2012.

143 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Tuberculose. 3. Isoniazida. 4. Farmacocinética. I. Poli, Anicleto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

**Estudo farmacocinético de um análogo lipofílico da isoniazida,
denominado JVA, administrado em camundongos”**

POR

Mariane Roman

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da
Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Prof. Dr. Anicleto Poli
Presidente (FMC/UFSC)

Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida
(UFJF/MG)

Prof. Dr. João Batista Calixto
(FMC/UFSC)

Prof. Dr. Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 09 de março de 2012.

À minha família....

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, professores Anicleto Poli e André Báfica pela oportunidade de realizar o meu mestrado nos seus laboratórios e pelas enormes contribuições à minha formação científica. Além disso, não poderia deixar de agradecer pela amizade, carinho e dedicação nestes últimos dois anos.

Em especial, às minhas colegas Tatiany, Verônica e Nicole que foram extremamente importantes no desenvolvimento deste trabalho, mas principalmente pela amizade que construímos nesse período em que vocês se tornaram parte da minha família.

Aos meus colegas de laboratório Nicoli, Stefanny, Lucas, Álvaro, Fernanda, Lívia, Renata, Paula, Ingrid, Cássia, Daniel, Jeferson e àqueles que por ali passaram neste período, pelo companheirismo, amizade, discussões e crescimento pessoal.

Aos colegas da turma de mestrado 2010 do Departamento de Farmacologia da UFSC, principalmente à Lara, Maíra, Karla, Muryel, Thiago, Paulo e Manuel pelas risadas nos corredores, experimentos e pela diferença que a presença de vocês representou nestes dois anos.

À minha amiga Raquel, que se tornou uma pessoa muito importante aqui em Florianópolis, nossa amizade nasceu de uma forma muito natural e hoje você é uma amiga muito especial.

Aos professores Daniel e Fernando que contribuíram muito para a minha formação científica neste período e pela nossa amizade.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Aos laboratórios de Farmacotécnica e de Caracterização Microestrutural (LCM) desta Universidade pela utilização de equipamentos e realização de experimentos em suas dependências.

Em especial a minha amiga Letícia Mazzarino que foi quem realmente me incentivou a vir para Florianópolis realizar esse meu desejo de continuar estudando, me trouxe na Farmacologia, mandou os editais da prova do mestrado e me acolheu na sua casa. Você foi decisiva na realização de mais esta etapa da minha vida. Não tenho palavras suficientes pra te agradecer.

Às minhas amigas, colegas, irmãs Iandra, Lauren, Paula, Tiane e Schanna por vocês fazerem parte da minha vida e porque a nossa amizade, apesar dos Km que nos separam é e sempre será a mesma.

Finalmente, às pessoas mais importantes na minha vida, meu filho Eduardo, o Mairos, minha mãe e meu pai, Marília e Nelmir, o Mateus, a Fabi, o Arthur e a Kathe por serem a minha família e meu apoio em todos os momentos. Obrigado por me incentivarem a realizar mais esta etapa na minha vida, pois sem o apoio de vocês isso não teria sido possível.

Em especial, ao Mairos e ao Dudu por terem conseguido superar e entender a minha ausência em diversos momentos importantes nesses últimos dois anos. AMO VOCÊS!!!!!!!

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma infecção das vias aéreas causada pela inalação de gotículas em suspensão do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Em 2010, estima-se que aproximadamente 8,8 milhões de pessoas tenham desenvolvido a doença, levando a morte de 1,1 milhões de pessoas em todo o mundo. O tratamento farmacológico para TB apresenta-se efetivo na maioria dos casos, porém o prolongado tempo da terapia associado aos efeitos adversos e a toxicidade diminuem a adesão dos pacientes, tendo como consequência o aumento no número de recidivas e o potencial desenvolvimento de resistência bacteriana. O desenvolvimento de análogos da isoniazida, com propriedades químicas mais favoráveis a sua penetração celular pode ser considerada uma estratégia na busca de novos tratamentos para a TB. A síntese de um análogo lipofílico da INH, denominado JVA, apresentou atividade antimicobacteriana *in vitro* semelhante à isoniazida e o tratamento de macrófagos infectados com cepa de *Mtb* por nanopartículas (NPs) poliméricas de PLGA que continham o JVA demonstrou atividade antimicobacteriana superior à forma livre. No presente trabalho, investigamos a capacidade de interação de NPs poliméricas na superfície do bacilo e também a sua interação com a bactéria no meio intracelular, além da análise da farmacocinética do JVA livre e em sistemas de liberação poliméricos administrado em camundongos. Técnicas de citometria de fluxo, MALDI-TOF/MS, imagens por AFM e microscopia confocal revelaram que NPs poliméricas de PLGA são capazes de interagir diretamente com a superfície do bacilo no meio intra e extracelular, podendo aumentar a exposição do bacilo aos antimicobacterianos, resultando em uma maior eficácia terapêutica. Para a realização dos estudos farmacocinéticos, desenvolveu-se e validou-se uma metodologia analítica por cromatografia líquida de fase-reversa. A validação do método demonstrou seletividade, linearidade, exatidão e precisão, sendo adequado para a sua utilização nos estudos farmacocinéticos subsequentes. As análises farmacocinéticas realizadas após a administração de JVA livre em camundongos pelas vias intraperitoneal (IP) e oral (VO) demonstraram que este composto apresenta uma rápida absorção ($T_{max} = 10$ e 15 min.), com uma meia-vida de eliminação curta (ca. 15 min.), alto volume de distribuição (~ 100 mL) e depuração plasmática (~ 5 mL/min.), resultando em uma rápida eliminação deste composto da circulação sistêmica. A administração pela VO reduziu sua biodisponibilidade em cerca de 40% quando comparado à via IP. Testes farmacocinéticos preliminares com a

utilização de NPs poliméricas pela via IP não se mostraram capazes de modificar o perfil farmacocinético observado com a administração do JVA livre. A partir disso, micropartículas poliméricas de PLGA, com um tamanho médio de 2 μm , foram produzidas para encapsular JVA e mostraram uma eficiência de encapsulação acima de 80%, com alto teor de JVA associado ao carreador. Ensaios de liberação de JVA a partir destes carreadores revelaram uma liberação praticamente nula do JVA em pH ácido e uma rápida e quase completa liberação quando em pH alcalino. A administração desses carreadores pela via IP e oral não foram capazes de modificar os parâmetros farmacocinéticos de meia-vida de eliminação, volume de distribuição e depuração de maneira significativa, porém, reduziram a biodisponibilidade do JVA. De maneira interessante, constatou-se que parte da dose administrada de JVA foi biotransformada em isoniazida, independente da via de administração escolhida e se este foi administrado livre ou em MPs. Porém, a conversão pela via oral foi mais significativa do que aquela observada pela via IP, ocorrendo de maneira semelhante com a administração de JVA livre ou encapsulado em MPs. Desta maneira, apesar de os parâmetros farmacocinéticos do JVA não terem sido considerados ideais para uma substância que se pretende usar na terapia antimicobacteriana este ainda deve ser investigado quanto a sua efetividade bactericida em modelos animais de TB. Devido a sua facilidade de permeação através de membranas e sua alta distribuição entre os tecidos espera-se observar um aumento no aporte de fármaco ao sítio da infecção, com redução no risco de desenvolvimento de resistência bacteriana e possibilidade de aumento da efetividade terapêutica.

Palavras-chave: tuberculose, análogo da isoniazida, farmacocinética, micropartículas de PLGA

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infection primarily caused by inhalation of droplets of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). In 2010, it has been estimated that approximately 8.8 million people have developed the disease, leading to death of 1.1 million people worldwide. Pharmacological treatment for TB is thought to be effective in most cases, but the prolonged therapy associated with adverse effects and toxicity decreases patient compliance, resulting in an increased number of recurrences and the potential development of bacterial resistance. The development of isoniazid (INH) analogs, with enhanced chemical properties for cellular penetration can be considered a strategy in the research for new treatments for TB. We have recently demonstrated that an INH lipophilic analog, named JVA, displays an in vitro antimycobacterial activity similar to that of INH and the nanoenabled system using JVA within PLGA nanoparticles (NPs) enhanced *Mtb* killing inside macrophages. In this study, we investigated the interaction of polymeric NPs with the surface of the bacillus and also their interaction with the bacteria in the intracellular environment, as well as pharmacokinetic analysis of the free JVA and polymeric delivery systems administered in mice. Flow cytometry, MALDI-TOF/MS, confocal and atomic force microscopy analyses revealed that JVA-NPs associate with both intracellular *Mtb* and cell-free bacteria, indicating that NPs directly interact with the bacterium. Regarding pharmacokinetic studies, we developed and validated an analytical method using reverse phase liquid chromatography. The method validation showed specificity, linearity, accuracy and precision and is suitable for use in subsequent pharmacokinetic studies. The pharmacokinetic analysis carried out after the administration of free JVA by intraperitoneal (IP) and oral route in mice demonstrated that this compound exhibits rapid absorption ($T_{max} = 10$ and 15 min.), with a short elimination half-life (~ 15 min.), high volume of distribution (~ 100 mL) and total clearance (~ 5 mL / min.), resulting in rapid elimination of this compound from circulation. Oral bioavailability is reduced by 40% compared to the IP route. Preliminary pharmacokinetic analyses with the IP polymeric NPs administration were not able to alter

the pharmacokinetic profile observed with administration of free JVA. Furthermore, PLGA microparticles (MPs) were produced to encapsulate JVA, which displayed an entrapment efficiency above 80%, with high content of JVA associated with the carrier, and the average diameter of MPs-JVA was approximately 2 μm . In vitro drug release studies for MPs-JVA have shown a very low drug release at acid pH and rapid and nearly complete when alkaline pH. The IP and oral administration of these carriers were not able to modify significantly the pharmacokinetic parameters of the elimination half-life, volume of distribution and clearance, but reducing the bioavailability of JVA. Interestingly, it was found that part of the administered JVA dose was biotransformed to isoniazid, independently of the administration routes and formulations. However, the JVA to INH conversion was higher by the oral than IP route, occurring in a similar way for free JVA or MPs-JVA administration. Although the pharmacokinetic parameters of JVA have not shown an extended half-life as expected, it deserves complementary investigations for their putative antimicrobial activity in animal models of TB. It is expected that its high permeation through the membrane and high distribution between tissues may increase the drug bioavailability to the site of infection, decreased risk of development bacterial resistance and increased therapeutic effectiveness.

Keywords: tuberculosis, isoniazid analogue, pharmacokinetics, PLGA microparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transmissão da tuberculose e formação do granuloma	30
Figura 2: Estrutura química dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB no Brasil.....	33
Figura 3: Rota de síntese do JVA.....	37
Figura 4: Figura esquemática do experimento realizado com MALDI –TOF/MS, BCG e NPs.....	52
Figura 5: Fluxograma extração de JVA das amostras de plasma.	55
Figura 6: Esquema de preparação de micropartículas de PLGA contendo JVA.....	60
Figura 7: Fluxograma extração de INH de amostras de plasma...	69
Figura 8: Interação entre NPs poliméricas e macrófagos infectados por <i>Mycobacterium</i>	72
Figura 9: Interação entre NPs poliméricas diretamente com <i>Mycobacterium</i>	73
Figura 10: Análise da presença do íon de JVA (m/z 272) por MALDI-TOF/MS na superfície das bactérias incubadas com NPs JVA e JVA livre.....	74
Figura 11: Exemplos de cromatogramas obtidos por CLAE para análise de JVA em plasma de camundongos.....	76
Figura 12: Curvas de calibração construídas após análise por CLAE de amostras de plasma contaminadas com JVA.....	76
Figura 13: Estabilidade do JVA em solução e em amostras de plasma contaminadas com o analito.....	79
Figura 14: Curvas de concentração plasmática em função do tempo após administração de JVA livre pelas vias IP e VO.....	80
Figura 15: Curva de concentração plasmática em função do tempo obtida após administração de NPs JVA pela via IP.....	82
Figura 16: Curva de calibração obtida através da análise por CLAE dos padrões de JVA.....	84
Figura 17: Cromatogramas obtidos por CLAE do padrão de JVA, precipitado de MPs brancas, MPs JVA e sobreposição das análises da suspensão total.....	84

Figura 18: Eficiência de encapsulação, teor de fármaco e taxa de recuperação de MPs de PLGA preparadas com diferentes concentrações de JVA.....	86
Figura 19: Eficiência de encapsulação e teor de JVA em MP50.	87
Figura 20: Gráficos da distribuição granulométrica de MPs brancas e de MPs de JVA.....	88
Figura 21: Fotomicrografias de MPs poliméricas brancas e com JVA obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	89
Figura 22: Perfil de liberação de JVA a partir de MPs poliméricas de PLGA em diferentes meios de liberação	90
Figura 23: Avaliação da viabilidade celular por MTT e morte celular de cepa H37Rv após o tratamento por 7 dias das culturas com JVA livre e MPs de JVA.....	91
Figura 24: Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de JVA livre e em MPs pelas vias IP e oral em camundongos	92
Figura 25: Curva de calibração obtida através da análise por CLAE das amostras de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de INH	95
Figura 26: Curva de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de INH livre pela via oral em camundongos	97
Figura 27: Perfis plasmáticos de JVA e INH obtidos após a administração de JVA livre e em MPs pela VO em camundongos	99
Figura 28: Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de INH livre e JVA livre ou encapsulado em MPs pela via oral	100
Figura 29: Concentração plasmática de INH após administração de JVA pela via IP	102
Figura 30: Curvas de concentração plasmática de INH em função do tempo obtidas após administração de MPs de JVA pelas vias IP e VO.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema da placa de cultura utilizada no ensaio de MTT e contagem de UFC após tratamento de <i>Mtb</i> com JVA e MPs JVA..	65
Tabela 2: Variabilidade e reprodutibilidade do método cromatográfico do intraensaio e interensaio para o JVA e recuperação obtidos em plasma de camundongo após extração das amostras e análise por CLAE.....	78
Tabela 3. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de JVA livre obtidos em camundongos após a administração pelas vias intraperitoneal e oral.....	81
Tabela 4: Distribuição granulométrica de MPs brancas e de JVA...	87
Tabela 5. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de JVA livre e encapsulado em MPs obtidos em camundongos após a administração pelas vias intraperitoneal e oral.....	93
Tabela 6: Variabilidade e reprodutibilidade do método cromatográfico do intraensaio e interensaio para INH e recuperação obtidos em plasma de camundongo após análise por CLAE.....	96
Tabela 7. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de INH livre obtidos em camundongos após a administração pela VO	97
Tabela 8. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de INH obtidos em camundongos após a administração de INH solúvel pela via oral e de JVA livre e encapsulado em MPs.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BCG	Bacilo Calmette-Guérin (<i>M. bovis</i>)
BCG-RFP	<i>M. bovis</i> BCG cepa Pasteur que expressa uma proteína fluorescente vermelha (dsRed1)
BMM's	Macrófagos murinos derivados de medula óssea
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cmax	Concentração plasmática máxima
CO₂	Gás carbônico
CV	Coefficiente de Variação
DAPI	4'-6- diamino-2- fenilindol
DMEM	Meio Eagle modificado Dulbecco's
DP	Desvio Padrão
EMB	Etambutol
EPM	Erro Padrão da Média
INH	Isoniazida
IP	Intraperitoneal
JVA	Ácido <i>E-N</i> ² -3,7- dimetil-2-E,6-octadienilidenil isonicotínico hidrazida
MALDI-TOF/MS	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo/Espectrometria de Massas
MDR-TB	Tuberculose Multirresistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	Concentração inibitória mínima
MPs	Micropartículas
MOI	Multiplicidade de infecção

Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NPs	Nanopartículas
NP-FITC	Nanopartículas com corante fluoresceína
OADC	Ácido oléico –albumina-catalase-dextrose
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Para-aminosalicílico
PBS	Tampão fosfato-salina
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PLGA	Ácido poli (D,L-lático-co-glicólico)
PVA	Álcool polivinílico
PZA	Pirazinamida
r²	Coefficiente de correlação linear
RFP	Proteína fluorescente vermelha
RIF	Rifampicina
RP-C18	Coluna de fase reversa de octadecilsilano
RPM	Rotações por minuto
S	Estreptomicina
T_{1/2 abs}	Tempo de meia-vida de absorção
T_{1/2el}	Tempo de meia- vida de eliminação
TB	Tuberculose
T_{max}	Tempo em que C _{max} é atingida
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VD	Volume de distribuição
VO	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. OBJETIVOS.....	25
1.1.1 Objetivo Geral.....	25
1.1.2 Objetivos Específicos.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 TUBERCULOSE.....	27
2.1.1 Epidemiologia.....	27
2.1.2 A doença.....	28
2.1.3 Diagnóstico.....	30
2.1.4 Tratamento.....	31
2.2 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E BUSCA DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS.....	34
2.3 SISTEMAS POLIMÉRICOS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE.....	39
2.4 FARMACOCINÉTICA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E NO ESTUDO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 MATERIAIS.....	45
3.1.1 Matérias-primas.....	45
3.1.2 Solventes, reagentes e soluções.....	45
3.1.3 Equipamentos.....	46
3.2 METODOLOGIA.....	47
3.2.1 Estudo da interação entre nanopartículas poliméricas e macrófagos infectados por citometria de fluxo e microscopia confocal.....	47
3.2.1.1 Preparação de nanopartículas de PLGA contendo JVA.....	47
3.2.1.2 Obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos.....	48
3.2.1.3 Citometria de fluxo.....	49
3.2.1.4 Microscopia confocal.....	49

3.2.2 Estudos da associação entre nanopartículas poliméricas e <i>Mycobacterium</i> por citometria de fluxo, microscopia de força atômica e MALDI-TOF/MS.....	50
3.2.2.1 <i>Citometria de fluxo.....</i>	50
3.2.2.2 <i>Microscopia de Força Atômica (AFM).....</i>	50
3.2.2.3 <i>MALDI-TOF/MS.....</i>	51
3.2.3 Obtenção do perfil farmacocinético de JVA em plasma de camundongos após administração pelas vias oral e intraperitoneal.....	52
3.2.3.1 <i>Animais.....</i>	52
3.2.3.2 <i>Preparação do JVA para administração.....</i>	52
3.2.3.3 <i>Protocolo Experimental.....</i>	53
3.2.3.4 <i>Análise das amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	53
3.2.3.4.1 <i>Validação do método analítico.....</i>	55
3.2.3.5 <i>Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.....</i>	57
3.2.4 Obtenção do perfil farmacocinético de JVA encapsulado em <u>nanopartículas</u> em plasma de camundongos após administração intraperitoneal	58
3.2.5 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos de JVA encapsulado em <u>micropartículas</u> poliméricas de PLGA administrados em camundongos pelas vias oral e intraperitoneal	59
3.2.5.1 <i>Preparação, caracterização e avaliação da atividade antimicobacteriana de micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA.....</i>	59
3.2.5.1.1 <i>Preparação de micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA</i>	59
3.2.5.1.2 <i>Determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação das micropartículas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	60
3.2.5.1.3 <i>Caracterização morfológica das micropartículas poliméricas de PLGA.....</i>	62

3.2.5.1.4 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> de JVA a partir das micropartículas de PLGA em diferentes meios de liberação.....	62
3.2.5.1.5 Avaliação da atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i> de micropartículas de PLGA contendo JVA	63
3.2.5.2 <i>Análise farmacocinética de JVA encapsulado em micropartículas poliméricas em plasma de camundongos após administração pelas vias oral e intraperitoneal</i>	66
3.2.6 Análise farmacocinética de isoniazida livre em plasma de camundongos após administração pela via oral	67
3.2.6.1 <i>Quantificação de INH em plasma de camundongo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	67
3.2.6.1.1 Validação parcial do método analítico.....	69
3.2.7 Análise estatística.....	69
4. RESULTADOS.....	71
4.1 ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA E MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	71
4.2 ANÁLISE DA INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E <i>MYCOBACTERIUM</i>	72
4.3 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA LIVRE ADMINISTRADO PELAS VIAS INTRAPERITONEAL E ORAL.....	75
4.3.1 Validação de método cromatográfico para dosagem de JVA em plasma de camundongos.....	75
4.3.2 Análise farmacocinética de JVA livre administrado pelas vias intraperitoneal e oral.....	79
4.4 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA ENCAPSULADO EM <u>NANOPARTÍCULAS</u> POLIMÉRICAS DE PLGA.....	82
4.5 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA ENCAPSULADO EM <u>MICROPARTÍCULAS</u> POLIMÉRICAS DE PLGA.....	83

4.5.1 Caracterização das micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA.....	83
4.5.2 Avaliação da atividade antimicobacteriana de micropartículas de JVA em culturas de <i>Mtb</i> H37Rv.....	90
4.5.3 Análise farmacocinética de JVA encapsulado em <u>micropartículas</u> poliméricas de PLGA	91
4.6 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE ISONIAZIDA EM PLASMA DE CAMUNDONGOS.....	94
4.6.1 Análise cromatográfica por CLAE	94
4.6.2 Quantificação de isoniazida em plasma de camundongos após administração de INH pela VO.....	96
4.6.3 Quantificação de isoniazida em plasma de camundongos que receberam JVA pela VO.....	98
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICE A	141
ANEXO 1	143

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é primariamente uma infecção das vias aéreas causada pela inalação de gotículas em suspensão que contém o *Mycobacterium tuberculosis*. Acredita-se que 1/3 da população mundial esteja infectada com o bacilo, porém somente 5 a 10% das pessoas desenvolvem a doença. Apesar disso, somente em 2010, estima-se que aproximadamente 8,8 milhões de pessoas tenham desenvolvido a doença, levando ao óbito de 1,1 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, o número de casos neste mesmo ano chegou a 72 mil novos casos com cerca de 3 mil óbitos associados a TB (WHO, 2011).

O tratamento farmacológico para TB apresenta-se efetivo em 95% dos casos, desde que o bacilo seja sensível aos antimicrobianos utilizados, porém alguns problemas relacionados à terapia apresentam-se como principais responsáveis pelas falhas terapêuticas observadas em algumas situações. O prolongado tempo da terapia, que é de 6 a 9 meses para o regime básico, podendo se estender até dois anos em situações de recidiva ou resistência, associado aos efeitos adversos gastrointestinais como náuseas e vômitos, icterícia, perda de equilíbrio, alterações visuais, problemas de audição, neuropatia periférica e até cegueira e a toxicidade diminuem a adesão dos pacientes, tendo como consequência o aumento no número de recidivas e o potencial desenvolvimento de resistência bacteriana (BRASIL, 2010; KOUL *et al.*, 2011)..

O aparecimento da resistência bacteriana nos casos de tuberculose é crítico, pois a falta de eficácia aos fármacos de primeira linha leva o paciente a ter de utilizar fármacos mais tóxicos, por períodos mais prolongados, onerando consideravelmente o sistema de saúde. Atualmente, no Brasil, a terapia básica contra a TB envolve a administração de quatro fármacos juntos, isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB), nos dois primeiros meses, seguindo a terapia de manutenção com INH e RIF por mais quatro meses. A terapia atual foi alterada, acrescentando-se o EMB devido à verificação do aumento na incidência de resistência bacteriana a INH e RIF no Brasil (BRASIL, 2010).

Todas estas limitações levam à necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, bem como de novas estratégias terapêuticas que aumentem a eficácia do tratamento e reduzam o risco do aparecimento da resistência bacteriana.

Dentre os fármacos de primeira linha, destaca-se a INH, um dos mais potentes agentes sintéticos contra *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando uma baixa concentração inibitória mínima (MIC) na faixa

de 0,02 - 0,05 µg/ml. Embora amplamente utilizada, a INH apresenta efeitos adversos relacionados à toxicidade hepática e neuronal, além de elevado risco de desenvolvimento de resistência, devido principalmente a sua baixa penetração intracelular que pode estar relacionada à sua característica físico-química de hidrofiliidade (VILCHEZE e JACOBS, 2007). O desenvolvimento de análogos da isoniazida pode ser considerado uma estratégia na busca por novos fármacos a serem utilizados no tratamento da TB. Desta forma, sintetizou-se um análogo da INH, chamado JVA, que se apresentou como uma molécula mais hidrofóbica. Em estudos *in vitro* utilizando cepa H37Rv de *Mtb* este composto apresentou um efeito antimicobacteriano semelhante a INH, revelando que as alterações estruturais na molécula mantiveram o seu efeito farmacológico (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012).

Além disso, o contínuo crescimento da tecnologia farmacêutica tem levado ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas tradicionais. O uso de sistemas nano e microestruturados tem se tornado uma estratégia interessante no que diz respeito à alteração das características biofarmacêuticas dos antimicrobianos, permitindo uma liberação prolongada através da membrana do carreador, o aumento da biodisponibilidade dos fármacos no sítio de ação, redução de dose e melhora da posologia sem comprometimento da eficácia terapêutica, além da capacidade de vetorização ativa ou passiva de fármacos a tecidos e células alvos (BLASI *et al.*, 2009; PANDEY e AHMAD, 2011; VRIGNAUD *et al.*, 2011). Nano e micropartículas poliméricas podem ser produzidas empregando-se polímeros biodegradáveis e biocompatíveis como é o caso do ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA).

Nanopartículas (NPs) de PLGA encapsulando JVA foram produzidas, caracterizadas e testadas quanto a sua atividade antimicobacteriana em culturas de macrófagos infectados com *Mtb* (cepa H37Rv). Os resultados mostraram que as NPs contendo JVA foram mais efetivas do que o composto livre quanto a sua atividade antimicobacteriana. Nestes casos, verificou-se a diminuição, de modo dose dependente, na contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após a lise dos macrófagos e plaqueamento das culturas em meio sólido 7H10 (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012).

Assim, a partir desses resultados prévios de nosso grupo, a proposta deste trabalho é investigar se ocorre uma possível interação entre as NPs e células fagocíticas infectadas por *Mtb*. Ainda mais, será que essas NPs são capazes de se associar de uma forma direta com o

bacilo, aumentando a biodisponibilidade dos fármacos e melhorando a efetividade do tratamento antimicobacteriano.

Além disso, um estudo farmacocinético *in vivo* do JVA livre ou encapsulado em sistemas poliméricos se faz necessário para a melhor compreensão da cinética desta molécula no organismo, uma vez que se trata de uma molécula recentemente sintetizada que apresentou efeitos antimicobacterianos *in vitro* e que futuramente poderá ser utilizada para estudos da sua eficácia antimicobacteriana em modelos animais de TB.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a interação entre partículas poliméricas de PLGA com o bacilo da tuberculose, além de determinar o perfil farmacocinético de um análogo da isoniazida, o JVA, livre ou encapsulado em micropartículas poliméricas de PLGA, administrado por via oral e intraperitoneal em camundongos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar uma possível interação entre nanopartículas poliméricas e macrófagos infectados por *Mycobacterium* no meio intracelular e diretamente com bacilo;
- Preparar e caracterizar micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA;
- Avaliar o perfil farmacocinético de JVA livre e encapsulado em micropartículas poliméricas administrado em camundongos pelas vias oral e intraperitoneal;
- Avaliar a possível conversão de JVA em isoniazida através de uma avaliação farmacocinética comparativa com a administração de isoniazida em camundongos pela via oral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TUBERCULOSE

2.1.1 Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa, que acomete primariamente as vias aéreas, contraída a partir da inalação do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Encontra-se entre os grandes problemas da saúde pública em diversos países, sendo a segunda doença infecciosa que mais mata em todo o mundo, ficando apenas atrás do número de óbitos provocados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (BRASIL, 2011; WHO, 2011).

De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de um terço da população mundial pode estar infectada pelo bacilo, podendo grande parte dessas pessoas vir a adoecer ou transmitir a doença. Dados de 2010, publicados pela OMS, revelaram que a incidência mundial de novos casos de tuberculose foi de aproximadamente 8,8 milhões de pessoas e em torno de 1,1 milhões de óbitos ocorreram em decorrência da doença. Em pacientes HIV positivos, neste mesmo ano, foram registrados 350.000 óbitos associados à coinfeção. Em 2009, existiam cerca de 10 milhões de crianças órfãs no mundo como resultado da morte de seus pais por tuberculose (WHO, 2011). O Brasil, juntamente com outros 22 países respondem por 80% dos casos de tuberculose em todo o mundo, sendo registrados em 2010 em torno de 72 mil novos casos de tuberculose, com média de 200 ao dia e cerca de 2 a 3 mil óbitos ao ano (BRASIL, 2011).

Devido a esta situação mundial, em 1993, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência global, lançando neste mesmo ano um conjunto de recomendações para auxiliar os países no controle da TB, além de tentar uniformizar o tratamento em diversas partes do mundo. Este programa chamou-se *DOTS* (Directly Observed Treatment Short-course), tendo como principais objetivos o compromisso político dos países em diagnosticar a doença através de métodos bacteriológicos de qualidade com aporte financeiro necessário, supervisionar a terapia padrão e fornecer os medicamentos com qualidade e em quantidade suficiente além de monitorar e avaliar o impacto das medidas tomadas através desta política (WHO, 2009).

Em 2006, após avaliação dos resultados obtidos com o *DOTS*, a OMS lançou novos desafios para o milênio em um documento

denominado *Stop TB Strategy*. Este documento traz como visão um mundo livre de tuberculose e apresenta como meta reduzir drasticamente o ônus global com TB até 2015. Para isso, apresenta como estratégias principais buscar a ampliação e o aperfeiçoamento do DOTS, monitorar os casos de TB multirresistente e HIV/TB, contribuir para o fortalecimento dos sistemas de saúde, ter o apoio da comunidade e dos pacientes doentes na prevenção de novos casos e, principalmente, permitir e desenvolver a pesquisa em busca de novos métodos de diagnóstico, novos fármacos e vacinas (WHO, 2008).

Baseado nos últimos dados epidemiológicos obtidos tanto em nível mundial como em relação ao Brasil, observou-se uma queda na incidência e prevalência de casos de tuberculose, e estima-se que cinco das seis regiões delimitadas pela OMS irão alcançar os objetivos estabelecidos até 2015 (WHO, 2011). Contudo, cabe ressaltar que ainda é extremamente alto o número absoluto de casos de TB diagnosticados, e que o óbito de aproximadamente um milhão de pessoas em todo o mundo traz consequências sociais e econômicas significativas, pois uma grande parte dos casos atinge a população economicamente ativa de diversos países (DYE e WILLIAMS, 2010).

2.1.2 A doença

A contaminação pelo *Mtb* inicia-se após a inalação de gotículas suspensas no ar que contém o bacilo. Em seguida, as bactérias depositam-se no espaço alveolar e são fagocitadas por macrófagos alveolares, induzindo uma inflamação local que recruta células mononucleares circulantes constituindo a matriz inicial para a formação do granuloma, o qual é formado pelas células de defesa do organismo com o objetivo de limitar a infecção e conter o avanço da doença. Células dendríticas também fagocitam os bacilos e participam da ativação de células T nos linfonodos que migram para o granuloma (Fig. 1a-c) (Griffiths *et al.*, 2010; Russell *et al.*, 2010).

Com a chegada dos linfócitos, o granuloma apresenta uma estrutura organizacional mais definida que contém no centro macrófagos infectados rodeados por macrófagos epitelióides e células espumosas cercados por linfócitos T e B e fibroblastos que delimitam a estrutura através da deposição de colágeno (Fig. 1d). Duas a três semanas pós-infecção ocorre o final da replicação rápida da bactéria, o granuloma encontra-se bastante vascularizado e as células são extensivamente recrutadas para o local da lesão. Com o passar dos dias, a vascularização diminui, aumentando a formação de fibrose na periferia e no centro

ocorre um aumento no número de células espumosas que são responsáveis pelo aumento das lesões caseosas. Esta porção caseosa apresenta hipóxia, que quando em cultura esta situação induz a um estado de não replicação do bacilo. Em pacientes que apresentam tuberculose ativa, granulomas em diversos estágios de desenvolvimento são encontrados em diferentes locais (RUSSELL *et al.*, 2010).

A liberação de citocinas como TNF α pelos macrófagos e de interferon γ (IFN) pelos linfócitos apresenta uma ação sinérgica na atividade bactericida dos macrófagos provocando o aumento da atividade antimicobacteriana destas células através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Linfócitos T CD4 liberam linfotóxina α (LT α) que também atua na proteção contra a tuberculose. Demais linfócitos como T CD8, T $\gamma\delta$ e T CD1 secretam perforinas e granulósina que matam os bacilos dentro dos macrófagos (KAUFMANN, 2002; DORHOI *et al.*, 2011).

A formação e manutenção do granuloma envolve uma interação complexa e extremamente dinâmica de diversos tipos de células T, macrófagos em diferentes estágios de maturação e células dendríticas, além de citocinas como TNF α e IFN γ (KAUFMANN, 2002; EGEN *et al.*, 2008). Durante a evolução da infecção, pode-se conseguir a esterilização localizada da infecção e seguir com a mineralização da lesão ou culminar com a liquefação e necrose que provoca a liberação do bacilo nas vias aéreas (RUSSELL *et al.*, 2009). Todavia, se ocorre uma redução na ação do sistema de defesa, a estrutura organizacional do granuloma pode se desfazer liberando a micobactéria para diferentes tecidos, órgãos e para o ambiente. Deste modo, desenvolve-se a doença ativa e o paciente também passa a transmitir a doença (KAUFMANN, 2002).

Mantendo-se uma resposta imune competente que consiga conter a replicação do bacilo, o paciente não irá desenvolver a doença. Sabe-se que somente 5 a 10 % das pessoas que estão infectadas com o bacilo desenvolvem tuberculose (KAUFMANN, 2001).

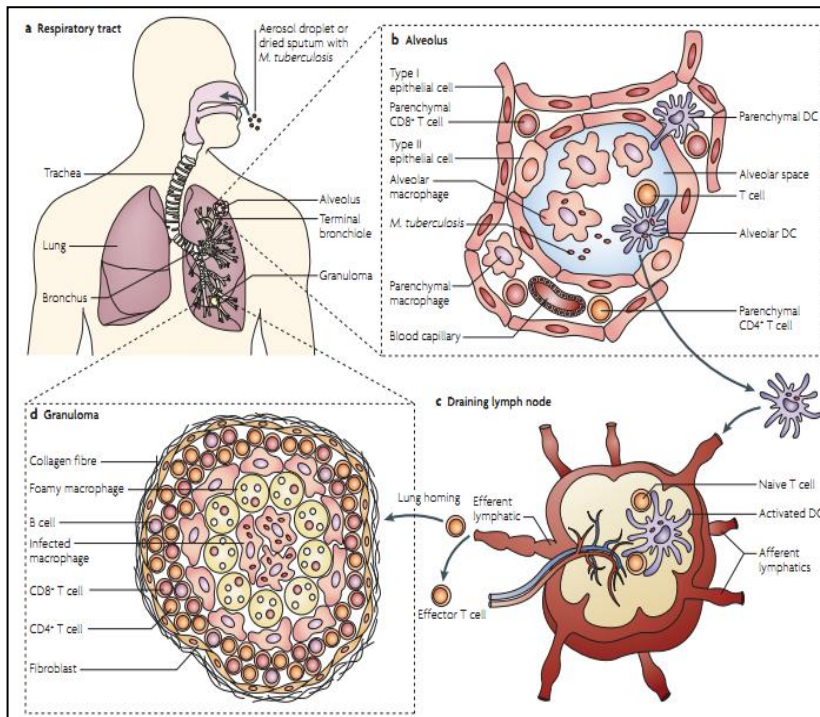


Figura 1: Transmissão da tuberculose e formação do granuloma.

Fonte: Griffiths *et al.*, 2010.

Os principais sintomas clínicos apresentados na tuberculose pulmonar incluem tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento. As formas mais graves de tuberculose pulmonar, chamada miliar, incluem sintomas idênticos aos citados acima, além de que o exame físico mostra hepatomegalia, podendo ocorrer alterações do sistema nervoso central e alterações cutâneas do tipo eritemato-máculo-papulo-vesiculosas. É uma forma mais grave da doença que acomete cerca de 10% dos pacientes HIV positivos e 1 % dos soronegativos (BRASIL, 2011).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da tuberculose pulmonar, a forma mais comum da doença, inicia-se através da observação de sinais clínicos do paciente,

dando-se atenção especial aos sintomas respiratórios. Exames radiológicos e bacteriológicos devem ser realizados para a confirmação do diagnóstico clínico de TB.

A radiografia de tórax apresenta-se como um método de diagnóstico de grande importância e deve ser solicitada para todo o paciente com suspeita clínica de TB pulmonar (BURRILL *et al.*, 2007).

O exame bacteriológico pode ser utilizado para uma triagem inicial. O Ministério da Saúde recomenda a baciloscopia direta, através da busca ativa do bacilo álcool-ácido resistente – BAAR, pelo método de Ziehl-Nielsen em escarro de pacientes com suspeita de TB. O exame direto no escarro deve ser feito em duas amostras, uma no dia da consulta e outra no dia seguinte preferencialmente ao acordar (BRASIL, 2011).

A confirmação do resultado bacteriológico pode ser feito através de cultura, pois é um método de elevada especificidade e sensibilidade. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% a confirmação do diagnóstico de TB. Além disso, a cultura permite a realização de testes de sensibilidade para busca de cepas resistentes e a identificação da espécie realizada através de ensaios bioquímicos e moleculares (BRASIL, 2011).

Novos métodos de diagnóstico com resultados mais rápidos que podem ser utilizados no diagnóstico da doença e na identificação de cepas resistentes, recomendados pela OMS, como por exemplo, o Xpert MTB/RIF, que utiliza a amplificação de ácidos nucleicos para o diagnóstico de TB e de TB resistente a rifampicina estão sendo avaliados pela ANVISA e pelo Ministério da Saúde para serem implementados no Brasil (BRASIL, 2011; WHO, 2011).

2.1.4 Tratamento

Em 1882, Robert Koch descreveu, em uma apresentação na Sociedade de Fisiologia em Berlim, a descoberta do agente causador da TB e o chamou de bacilo da tuberculose (BARNES, 2000). Contudo, somente 62 anos após a descoberta do agente etiológico da TB, o primeiro antibiótico para o tratamento desta doença surgiu, em 1944, quando o cientista Selman Waksman e colaboradores isolaram e purificaram a estreptomicina (S). Este antibiótico, já no mesmo ano, foi testado quanto a sua atividade antimicobacteriana *in vitro* e *in vivo*, obtendo-se resultados satisfatórios, sendo assim descoberto o primeiro antibiótico para o tratamento da TB (BLASI *et al.*, 2009).

Todavia, nos anos subsequentes, ensaios clínicos randomizados com pacientes demonstraram a seleção de cepas resistentes à estreptomicina. Então foi introduzida a terapia combinada de estreptomicina com o ácido p-aminosalicílico (PAS), observando-se a redução na indução de cepas resistentes quando comparado ao tratamento realizado somente com a estreptomicina (MITCHISON, 2005).

Já em 1952, descobriu-se a isoniazida (INH), que apresentava uma atividade antimicobacteriana superior a S e ao PAS, além de ser mais segura quando comparada as anteriores. A monoterapia com INH chegou a ser investigada, porém observou-se o rápido aparecimento de cepas resistentes e esta tentativa então foi abandonada (MADRAS., 1960). Então, realizaram-se ensaios clínicos que associaram a INH aos dois antimicrobianos e a terapia combinada foi incorporada à clínica. Após a verificação de que a resistência bacteriana ocorria somente a um dos fármacos, o tratamento passou a ser de três meses com os três fármacos seguidos por dois deles até completar um ano. Com o passar do tempo, novas moléculas foram testadas quanto à eficácia antimicobacteriana, dentre elas a rifampicina (RIF) e a pirazinamida (PZA), observando-se que ambas tinham potencial antimicobacteriano. Então, em 1970 iniciaram-se alguns estudos clínicos pelo mundo que tinham por objetivo estabelecer uma terapia antiTB mais efetiva e com menor tempo de tratamento. Os resultados destes estudos confirmaram a atividade sinérgica entre RIF e PZA e a redução no número de recidiva nos pacientes tratados com essa combinação associados à INH, reduzindo o tempo da terapia para seis meses (MITCHISON, 2005).

Em 1985, a terapia antiTB já era realizada em alguns países do mundo associando-se INH:RIF:PZA:S ou etambutol (EMB) por 6 meses (dois meses de tratamento combinado com os quatro fármacos, seguido de mais quatro meses de INH:RIF) ou utilizando uma terapia por 9 meses que utilizava no período inicial a mesma combinação dos 4 fármacos, seguido de administrações duas vezes por semana de INH e RIF (SNIDER *et al.*, 1985).

No Brasil, somente em 2009 a terapia padrão contra a TB passou a ser realizada acrescentando-se um quarto fármaco, o etambutol, na fase intensiva do tratamento que ocorre nos dois primeiros meses do esquema básico. Esta modificação foi adotada devido ao aumento da resistência bacteriana primária à isoniazida (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária à isoniazida associada à rifampicina (de 1,1 para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (BRASIL,

2010). Uma segunda mudança ocorrida foi a utilização da apresentação em comprimidos com dose fixa combinada dos quatro fármacos (4 em 1) para a fase intensiva do tratamento. A partir de então, a terapia do esquema básico no combate à TB consiste na combinação de quatro diferentes antibióticos, INH:RIF:PZA:EMB (Fig. 2) nos dois primeiros meses com a tomada dos comprimidos em doses fixas combinadas, seguido de mais quatro meses utilizando INH e RIF, sendo a posologia ajustada de acordo com a faixa de peso de cada paciente (BRASIL, 2010).

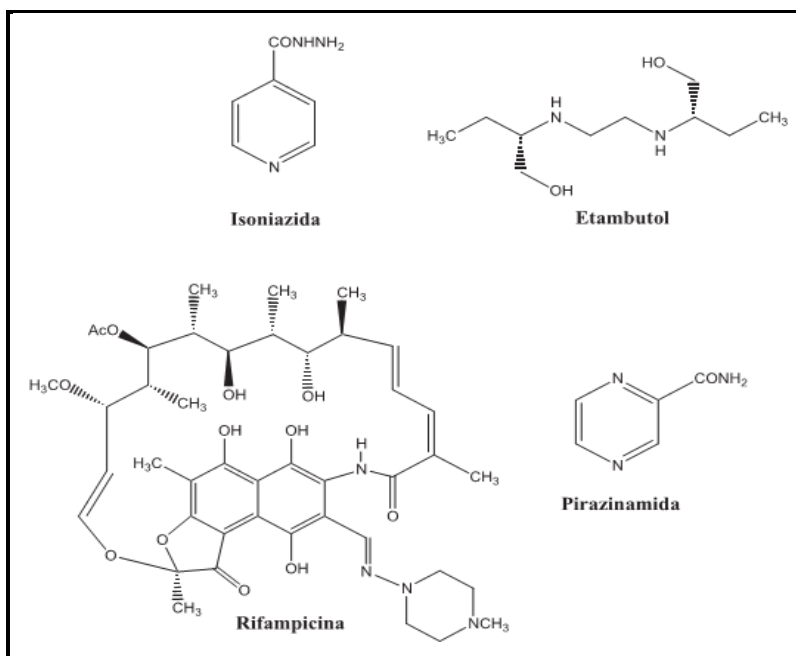


Figura 2: Estrutura química dos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB no Brasil.

Sabendo-se que a TB é uma doença infecciosa altamente curável, pois quando causada por cepas de *M. tuberculosis* sensíveis aos antibióticos 95% dos casos são resolvidos, pergunta-se porque a tuberculose ainda é um problema de saúde pública mundial?

Diversos são os fatores que podem ser levados em consideração ao se avaliarem estes aspectos, podendo-se dividir estes em fatores sociais e econômicos, de caráter imunológico ou relacionado à terapia. Em relação aos aspectos sociais, destaca-se a pobreza associada às más

condições de saúde e higiene em alguns países, a subnutrição e a falta de acesso à terapia e a um sistema de saúde adequado (SCHAIBLE e KAUFMANN, 2007; DYE e WILLIAMS, 2010). Além disso, o comprometimento da funcionalidade do sistema imune em razão do alcoolismo e de coinfeções dificultam o controle da doença e o próprio tratamento. Somente em 2010, cerca de 30% dos óbitos por tuberculose no mundo ocorreram em pacientes HIV positivos (BLASI et al., 2009; WHO, 2011). Dentre os fatores relacionados à terapia a falta de adesão dos pacientes devido à posologia incômoda de múltiplos comprimidos diários, efeitos adversos e a longa duração da terapia, levando algumas vezes ao abandono ou falha terapêutica são situações que merecem destaque (GRIFFITHS et al., 2010).

Além disso, um dos principais e mais sérios problemas enfrentados encontra-se no desenvolvimento da resistência bacteriana a múltiplos fármacos (MDR-TB), quando o bacilo se torna resistente a pelo menos um dos fármacos de primeira linha (INH ou RIF), que segundo dados da OMS, somente em 2010, estima-se que havia cerca de 290.000 pessoas infectadas com cepas multirresistentes, sendo que destas somente 16% foram tratadas de forma adequada (WHO, 2011). O regime recomendado para o tratamento destes pacientes requer um tempo longo, de cerca de 20 meses com fármacos de segunda linha que são mais onerosos e apresentam efeitos adversos mais sérios, além de que a taxa de cura para estes pacientes varia entre 60 e 75% (KOUL *et al.*, 2011; WHO, 2011). O aparecimento de cepas XDR-TB, isto é, que são resistentes a INH e RIF e a pelo menos uma fluorquinolona ou a um dos fármacos de segunda linha tornou a busca por novos medicamentos ativos contra estas cepas, ainda mais urgente, uma vez que a taxa de cura para estes pacientes é extremamente baixa (KOUL *et al.*, 2011).

Todas essas constatações tornam extremamente necessárias o desenvolvimento de novos fármacos ou novas estratégias terapêuticas que aumentem a eficácia do tratamento, com maior adesão do paciente e menor risco de desenvolvimento de resistência bacteriana.

2.2 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E BUSCA DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

Dentro dos objetivos da OMS lançados em 2006 através do documento *Stop TB Strategy* está o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da tuberculose, que preferencialmente tornem a terapia mais curta, com menos efeitos adversos e que sejam ativos contra cepas resistentes (WHO, 2011).

Uma das estratégias utilizadas para se obter novos fármacos é através da busca de novas moléculas partindo-se de modificações estruturais em compostos com atividade farmacológica conhecida (KUMAR *et al.*, 2009; KOUL *et al.*, 2011). Análogos de antimicobacterianos em uso na terapêutica vem sendo desenvolvidos e testados contra cepas sensíveis e resistentes de *Mtb*. Por exemplo, o análogo da RIF, a rifapentina encontra-se em estudos clínicos de fase II e III, avaliando-se a sua eficácia e a possibilidade de redução do tempo de terapia e tratamento da tuberculose latente em combinação com INH, com resultados em andamento (Sterling *et al.*, 2011).

Outro fármaco anti-TB, a INH, é um dos agentes sintéticos mais potentes contra *Mtb* descobertos até hoje, pois apresenta atividade com uma concentração inibitória mínima (MIC) muito baixa, na ordem de 0,02 – 0,05 µg/mL. Este fármaco entra na célula através de difusão passiva e age apenas contra bactérias em divisão, não exercendo qualquer efeito sobre micobactérias em fase estacionária ou de crescimento em condições anaeróbicas. Sua ação é bacteriostática nas primeiras 24 horas de tratamento e passa a ser bactericida após este período. A INH age induzindo alterações morfológicas nas micobactérias devido à inibição da síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais para a formação e manutenção da parede celular da micobactéria. É uma pró-droga e a sua ativação pela enzima catalase-peroxidase ocorre próximo a superfície bacteriana. Após sua ativação, liga-se a uma molécula de NAD, inibindo o alongamento das cadeias graxas que constituem os ácidos micólicos, através da ocupação do sítio ativo da enzima enoil-ACP redutase, também chamada de *inhA*. Este complexo possui alta afinidade de ligação à enzima *inhA*, sendo eficaz em doses terapêuticas baixas. Os mecanismos de resistência a INH geralmente estão associados a mutações em genes que codificam a enzima catalase peroxidase (*Kat G*) e também ao gene que codifica a *inhA* (JANIN, 2007; VILCHEZE e JACOBS, 2007).

Contudo, apesar de amplamente utilizada e de ser o principal antimicobacteriano em uso na terapêutica, acarreta efeitos adversos relacionados à sua toxicidade hepática e neuronal. Os efeitos adversos da INH dependem da posologia e ocorrem em cerca de 5% dos indivíduos, podendo obrigar o paciente a mudanças no tratamento. Os mais comuns são hepatite grave, fadiga, fraqueza, mal estar, convulsões, anorexia, náuseas, vômito e neuropatia periférica (devido à excreção urinária aumentada de piridoxina). Além disso, seu uso em monoterapia leva ao rápido desenvolvimento de resistência do bacilo devido

principalmente à baixa penetração intracelular do fármaco (VILCHEZE e JACOBS, 2007).

Modificações estruturais na molécula de isoniazida estão em estudo por diversos grupos de pesquisa com o objetivo de melhorar as características farmacêuticas (físico-químicas) e farmacológicas (farmacocinética/farmacodinâmica) da molécula, visando reduzir seus efeitos adversos e o desenvolvimento da resistência bacteriana. (MACCARI *et al.*, 2005; NAVARRETE-VAZQUEZ *et al.*, 2007; HEARN *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

Em relação às características biofarmacêuticas a INH apresenta-se como uma molécula hidrofílica com alta solubilidade em água, o que favorece sua absorção pela via oral. Esta hidrofiliidade é caracterizada pelo seu baixo valor de coeficiente de partição *n*-octanol/água (*Log P*), em torno de 0,64 de acordo com Budha *et al.* (2008). Estas características físico-químicas classificam a INH como um fármaco com alta hidrossolubilidade, porém baixa permeabilidade celular (BUDHA *et al.*, 2008). Diversos estudos tem sugerido que o aumento da atividade de alguns análogos da INH, frente até mesmo a cepas resistentes é devido ao aumento de sua hidrofobicidade, evidenciada pelo aumento no valor absoluto do coeficiente de partição *n*-octanol/água (*Log P*), o que aumentaria a penetração intracelular do fármaco através das membranas celulares em geral e principalmente o aumento da penetração intracelular na parede celular do *Mtb* (MACCARI *et al.*, 2005; NAVARRETE-VAZQUEZ *et al.*, 2007; HEARN *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009).

Seguindo neste contexto, um análogo da INH, com características mais hidrofóbicas, denominado JVA, foi sintetizado por Almeida e colaboradores (Fig. 3). A síntese desta molécula foi descrita previamente, porém de modo independente por Hearn *et al.*, (2009). A partir da determinação do coeficiente de partição *n*-octanol/água (*Log P*), observou-se que este composto apresenta características de hidrofobicidade (*Log P* de 3.20) bem mais elevada quando comparada a INH (*Log P* -0,8). Estudos de atividade antimicobacteriana *in vitro* em cepa de *Mtb* H37Rv demonstraram atividade similar entre a INH e JVA (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012).

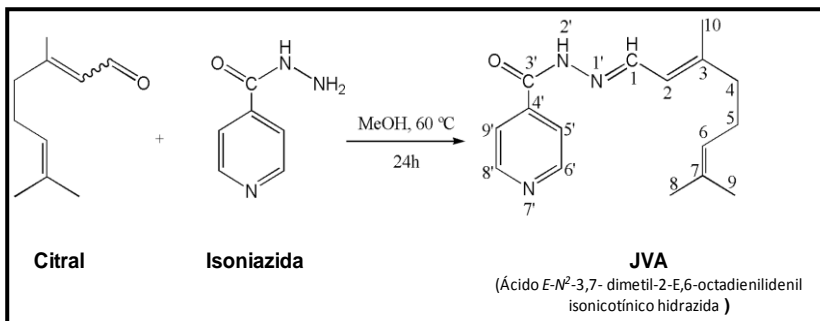


Figura 3: Rota de síntese do JVA a partir da condensação do citral com isoniazida

Mudanças nas características físico-químicas da molécula, como o aumento da sua hidrofobicidade apresentaram condições relevantes para encapsular este composto em sistemas de liberação nano e microestruturados. Sistemas de liberação de fármacos, baseados no uso da nanotecnologia, estão sendo amplamente pesquisados para melhorar as características farmacêuticas e farmacológicas de diversas substâncias utilizadas no tratamento de diferentes tipos de doenças, como câncer, diabetes, doenças infecciosas, entre outras (THIERRY, 2009; MALLIPEDDI e ROHAN, 2010; CARD e MAGNUSON, 2011).

O desenvolvimento de sistemas nano e microestruturados também pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças infecciosas, visando à otimização da ação do medicamento através da vetorização do fármaco ao sítio de ação. Dentre os vetores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (Schaffazick *et al.*, 2003). Esses sistemas podem apresentar como vantagens: o aumento da estabilidade do fármaco encapsulado no interior destes sistemas, proporcionarem o uso por diferentes vias de administração, liberarem de modo controlado a substância ativa no sítio de ação, além da capacidade de vetorização dos fármacos a tecidos e células alvo. O direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação pode não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade do fármaco a ser administrado para obtenção da resposta biológica, minimizando com isso os efeitos adversos (BLASI *et al.*, 2009; GRIFFITHS *et al.*, 2010; PANDEY e AHMAD, 2011).

Nanopartículas são sistemas coloidais com tamanho submicrométrico (< 1 µm), enquanto que as micropartículas apresentam tamanho superior a 1 µm. Nestes sistemas o fármaco encontra-se

dissolvido, associado, encapsulado ou ligado a uma matriz nanoestruturada (LASSALLE e FERREIRA, 2007).

Nano e micropartículas poliméricas, formadas a partir de polímeros biodegradáveis vem sendo pesquisadas com o objetivo de melhorar a terapia de diversas doenças, incluindo a tuberculose (PANDEY e AHMAD, 2011). Dentre esses polímeros, o PLGA tem sido extensamente empregado por ser biocompatível, biodegradável, apresentar uma boa resistência mecânica e ser bastante versátil na preparação de carreadores, encapsulando diferentes tipos de substâncias, desde fármacos até proteínas e peptídeos. A degradação desta matriz polimérica ocorre por hidrólise não enzimática em fluidos corporais, sendo que os produtos de sua degradação, os ácidos lático e glicólico, são compostos metabolizados pela via do Ciclo de Krebs e biotransformados pelas próprias células em água e gás carbônico. Por apresentar estas características é aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em sistemas de liberação (BARROW, 2004; FREDENBERG *et al.*, 2011a).

Diferentes técnicas de preparo podem ser utilizadas para se obter nano e micropartículas poliméricas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), dentre elas a dupla emulsão (água/óleo/água) com evaporação do solvente para encapsular fármacos e moléculas com características hidrofílicas e a nanoprecipitação para moléculas com características hidrofóbicas (LASSALLE e FERREIRA, 2007). Contudo, a encapsulação de fármacos hidrofílicos em sistemas poliméricos representa um desafio, uma vez que diversas variáveis, como as características físico-químicas da molécula, a escolha do polímero, da técnica empregada na preparação e mudanças de pH podem favorecer ou não a encapsulação destas moléculas em sistemas poliméricos. Geralmente o que ocorre é a saída do fármaco para fora do carreador pela sua preferência em permanecer na fase aquosa, uma vez que esses sistemas de liberação geralmente apresentam-se como suspensões coloidais aquosas (VRIGNAUD *et al.*, 2011). Em geral, técnicas como a nanoprecipitação e o método da difusão-emulsão apresentam valores de eficiência de encapsulação (relação entre a quantidade de fármaco adicionada à formulação e o que realmente ficou associado ao carreador), em torno de 10% (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Apesar de a literatura relatar que a técnica da dupla emulsão é mais indicada para a encapsulação de fármacos hidrofílicos, o nosso grupo, utilizando esta técnica, obteve uma eficiência de encapsulação em torno de 20% para a isoniazida. Porém, a eficiência de encapsulação obtida para o JVA, análogo da INH com característica mais hidrofóbica

apresentou um aumento de cerca de 4 vezes para a eficiência de encapsulação utilizando-se a técnica da nanoprecipitação, ficando esta entre 70 e 80% (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012), o que está de acordo com dados da literatura que relata que fármacos hidrofóbicos apresentam alta taxa de eficiência de encapsulação quando incorporados a sistemas poliméricos (BARICHELLO *et al.*, 1999; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

2.3 SISTEMAS POLIMÉRICOS NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

O problema fundamental no tratamento da TB é a longa duração da terapia, os efeitos adversos que muitas vezes levam o paciente ao abandono do tratamento resultando em falha terapêutica e o aparecimento da resistência bacteriana. Uma das tentativas para melhorar esta situação é o desenvolvimento e a utilização de diferentes sistemas de liberação de fármaco para aperfeiçoar a terapia, reduzindo-se o risco de ocorrer falha terapêutica (BLASI *et al.*, 2009; GRIFFITHS *et al.*, 2010; SOSNIK *et al.*, 2010; PANDEY e AHMAD, 2011). Desde a década de 90, diversos tipos de sistemas de liberação tem sido investigados para a administração de antimicobacterianos usando-se diferentes vias de administração, buscando uma entrega direcionada aos tecidos infectados, com redução de efeitos adversos, e melhor efetividade antimicobacteriana (BLASI *et al.*, 2009).

Alguns estudos envolvendo a administração de INH encapsulada em micropartículas de PLGA administrados pela via endovenosa, uma vez por mês, resultaram em aumento no tempo de circulação do fármaco, redução da hepatotoxicidade, e possível redução de dose, uma vez que em doses menores as micropartículas (MPs) foram efetivas na depuração pulmonar do bacilo (DUTT e KHULLER, 2001b; c; a). A administração de INH, RIF e PZA em MPs de PLGA pela via oral em camundongos aumentou a biodisponibilidade das drogas prolongando as meias-vidas de todos os fármacos (AIN *et al.*, 2002). Estudos posteriores em camundongos infectados demonstraram redução na contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia) no pulmão, fígado e baço de animais infectados, mesmo com a administração semanal das formulações, observando-se resultados equivalentes aos obtidos nos grupos tratados diariamente com os mesmos antimicobacterianos (UL-AIN *et al.*, 2003). Resultados semelhantes quanto ao aumento da biodisponibilidade e tempo de meia-vida, além de efetividade antimicobacteriana foram obtidos quando nanopartículas de PLGA

encapsulando os três fármacos, administrados pela via oral a cada 10 dias em modelo murino de tuberculose. A depuração total dos bacilos nos tecidos após cinco doses de nanopartículas foi comparável ao tratamento diário com os fármacos solúveis administrados por 46 dias (PANDEY, ZAHOR, *et al.*, 2003).

Além disso, outra via de administração extremamente interessante para o tratamento da tuberculose é a via pulmonar, uma vez que direciona o tratamento para o local da infecção onde são encontrados os macrófagos alveolares que estão infectados pelo *Mtb*. O uso desta via poderia reduzir os efeitos colaterais sistêmicos e melhorar a atividade antimicobacteriana dos fármacos empregados no tratamento da TB (PANDEY e KHULLER, 2005). Esta administração local tem por objetivo aumentar o aporte de fármaco disponível para o efeito farmacológico desejado. Para isso, é imperativo que haja uma interação entre nano e micropartículas com macrófagos. Neste sentido, alguns estudos demonstraram que estas células são capazes de interagir com sistemas de liberação, sendo estes geralmente internalizados (LAWLOR *et al.*, 2011). Para exemplificar, estudos de Barrow *et al.*, (1998), realizados *in vitro*, avaliaram a penetração e a atividade antimicobacteriana em macrófagos infectados por *Mtb* após o tratamento das culturas com micropartículas (7,5 e 15 μ m) contendo rifampicina. Estes autores observaram uma redução da toxicidade em comparação com o fármaco livre, aumento da concentração intracelular de RIF e da atividade antimicobacteriana, principalmente na formulação com menor tamanho de partícula. De modo semelhante, os resultados obtidos por De Faria, Roman, Souza, De Vecchi *et al.*, (2012) mostraram uma redução mais acentuada na contagem de UFC em macrófagos infectados com a utilização de nanopartículas de JVA quando comparado ao emprego do fármaco livre. Neste particular, obteve-se uma concentração intracelular maior de JVA quando este foi administrado em nanopartículas. Ainda mais, a intensidade do efeito foi proporcional ao aumento da dose.

No estudo de Pandey *et al.*, (2003), utilizando um modelo de tuberculose em cobaias, avaliou-se a efetividade do tratamento local após a administração de INH, RIF e PZA em nanopartículas sob a forma de aerossol. Os resultados mostraram um aumento no tempo de meia-vida dos fármacos, com aumento da biodisponibilidade relativa, quando comparado à administração pela via oral dos mesmos fármacos em solução. Por isso, o emprego pela via inalatória permitiu uma redução na frequência de doses, uma vez que cinco administrações das nanopartículas, uma a cada 10 dias, foi capaz de praticamente eliminar o

bacilo dos pulmões. Este resultado equivalente à administração diária por 46 dias dos fármacos solúveis pela via oral. Da mesma forma, MPs de rifampicina também foram administradas por inalação em cobaias observando-se as mesmas vantagens das nanopartículas, como prolongamento do tempo de permanência da RIF no pulmão, com possibilidade de redução no número de administrações sem comprometer a eficácia antimicobacteriana (GARCIA-CONTRERAS *et al.*, 2006).

Contudo, apesar de diversos estudos revelarem uma melhora na efetividade antimicobacteriana com a possibilidade de ajustes na posologia que favoreçam a adesão do paciente ao tratamento, a otimização das formulações para administração pulmonar deve ser investigada. Uma das características que merecem destaque é o tamanho de partícula, pois se sabe que partículas com tamanhos muito pequenos não são capazes de permanecer nos pulmões sendo expulsas pelo próprio movimento da respiração. Apesar de encontrarmos inúmeros trabalhos que citam a administração de nanopartículas pela via pulmonar, sabe-se que estas devem estar em tamanhos micrométricos para permanecer nos pulmões. O próprio trabalho de Pandey *et al.*, (2003) menciona a administração de nanopartículas com características aerodinâmicas ideais para inalação, com cerca de 1,88 μm . De acordo com Muttill *et al.*, (2009), partículas com tamanho entre 1 e 3 μm são adequadas para a permanência nos pulmões.

De um modo geral, observou-se que a utilização de sistemas de liberação em nano e micropartículas além de possibilitarem um tratamento localizado, no caso da administração pulmonar, em modelos animais de TB promoveram mudanças no perfil farmacocinético dos antimicobacterianos utilizados por outras vias. Estas alterações na farmacocinética estão relacionadas à mudanças de posologia ou à redução de toxicidade pela possibilidade de administração de menores quantidades dos fármacos com maior intervalo entre as doses. De certa forma, isso poderia aumentar a adesão ao tratamento pelos pacientes pela redução de doses e de efeitos adversos.

2.4 FARMACOCINÉTICA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E NO ESTUDO DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Dentre as diversas etapas envolvidas no desenvolvimento de novos fármacos está o estudo da farmacocinética e farmacodinâmica da molécula. Enquanto a farmacodinâmica estuda o mecanismo de ação do fármaco no organismo, a farmacocinética estuda o movimento das

drogas através dele. A compreensão da cronologia dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção de drogas pelo organismo são os alvos de estudos dentro da farmacocinética. O conhecimento destes parâmetros é de extrema relevância para estabelecer a atividade farmacológica da droga, uma vez que a ação farmacológica (farmacodinâmica) depende da presença do fármaco no sítio de ação em concentrações adequadas (SILVA, 2006).

Estudos farmacocinéticos estão envolvidos em praticamente todas as etapas do desenvolvimento de novos fármacos e segundo GOMBAR *et al.*, (2003), cerca de 50% das falhas clínicas na investigação de novas drogas devem-se a avaliação de parâmetros farmacocinéticos de absorção (A), distribuição (D), metabolismo (M), excreção (E) e toxicidade (T) serem considerados inadequados. Análises mais recentes mostram que a farmacocinética inadequada foi o maior contribuinte para falha de novas drogas na década de 90. Este foi o fator determinante para que as etapas de produção de novas drogas fossem reavaliadas e reorganizadas. Atualmente, o estudo farmacocinético de um novo candidato à droga é realizado no início dos estudos, através de ensaios *in vivo* e *in vitro* e na fase pré-clínica, a fim de evidenciar qualquer problema de absorção, distribuição, toxicidade, biodisponibilidade, que futuramente não viabilizariam a continuação do desenvolvimento desta molécula, otimizando desta forma o tempo e os custos necessários para desenvolvimento de novas drogas (GOMBAR *et al.*, 2003).

Para a avaliação farmacocinética de uma droga são calculados parâmetros que levam ao conhecimento do comportamento desta molécula no organismo, podendo-se com isso, relacioná-los a sua eficácia terapêutica. Os parâmetros farmacocinéticos são: a constante de absorção (k_{abs}), meia-vida de absorção ($t_{1/2abs}$), concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo em que isso ocorre (T_{max}), área sob a curva (AUC), volume de distribuição (V_d), tempo de meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), constante de eliminação (k_{el}) e a taxa de depuração. Além disso, estudos mais completos também visam a elucidar outros aspectos importantes que influenciam na eficácia terapêutica da droga, como o conhecimento da taxa de ligação a proteínas plasmáticas, da metabolização do fármaco, toxicidade, entre outros. O conhecimento destes parâmetros são de extrema relevância para caracterizar um fármaco e desta forma garantir o seu sucesso de desenvolvimento ou no caso de problemas com qualquer um desses parâmetros, tentar aperfeiçoar a molécula para superar possíveis problemas relacionados a ADMET.

A absorção de um fármaco pode ser influenciada pela sua solubilidade e permeabilidade. A permeabilidade de uma molécula está relacionada à sua hidrofobicidade, avaliada através de seu valor de *Log de P*, que quanto mais alto, significa maior hidrofobicidade. Baseado nestas evidências, Amidon *et al.*, (1995) propôs uma classificação biofarmacêutica de drogas relacionando a solubilidade e a permeabilidade. Assim, fármacos de classe I são aqueles com solubilidade e permeabilidade altas; de classe II, apresentam solubilidade baixa e permeabilidade alta; de classe III, são os de solubilidade alta e permeabilidade baixa; de classe IV, são os de solubilidade e permeabilidade baixas. Com base nesta classificação, as substâncias ideais para a absorção oral são as da classe I, enquanto que moléculas da classe IV não apresentam condições apropriadas para a absorção pela via oral. A taxa de absorção e a biodisponibilidade de uma molécula são influenciadas por esses parâmetros, além de outras características como ionização em pH fisiológico, carga e estabilidade da molécula (BUDHA *et al.*, 2008). Dentre os parâmetros farmacocinéticos que estão diretamente relacionados à absorção estão a constante de absorção, o tempo de meia-vida de absorção, o Cmax, Tmax e a AUC.

Após a droga chegar à circulação, esta é distribuída para o organismo. Porém, essa distribuição pode não ser uniforme e depende também de características físico-químicas como a carga e a lipofilicidade, além da possível interação com macromoléculas, como é o caso da interação com proteínas plasmáticas. Substâncias com alta ligação a proteínas plasmáticas tendem a ficar retidas na circulação e menos disponíveis para ação farmacológica, pois somente a fração livre é capaz de atingir o sítio de ação. Além disso, também ocorre uma diminuição no metabolismo e na excreção de moléculas com alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas (BUDHA *et al.*, 2008). O volume de distribuição (Vd) é um dos parâmetros que permite prever a transferência das substâncias para os compartimentos do organismo, sabendo-se que este relaciona a quantidade de droga no corpo com a quantidade presente na circulação sistêmica. Moléculas de fármacos lipofílicos tendem a se acumular nos tecidos e por isso apresentam Vd mais altos (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

A biotransformação de drogas no organismo tem por objetivo torná-las mais polares para facilitar a sua eliminação principalmente pelos rins. O fígado é nosso principal órgão responsável pelo metabolismo. Ocorrem reações enzimáticas que geralmente levam a perda da atividade farmacológica, porém, em algumas situações, o

metabolismo pode tornar o fármaco mais potente. Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo, a família do citocromo P450 é a mais ativa, sendo responsável por reações de oxidação e redução que levam a modificações na molécula para posterior eliminação (SILVA, 2006).

A meia-vida de eliminação é o tempo requerido para que ocorra a redução de metade da concentração plasmática de uma droga. É um parâmetro facilmente calculado pela fase de decaimento da curva de concentração plasmática em função do tempo. Também pode ser obtida a partir do volume de distribuição e da taxa de depuração. Esta última, indica a taxa de remoção da droga do organismo, quer seja, por metabolismo hepático ou por excreção renal da substância. Estes parâmetros, tomados juntos, são de vital importância para o estabelecimento da posologia de um fármaco (BUDHA *et al.*, 2008).

As características farmacocinéticas ideais de um novo fármaco anti-TB visam a obter moléculas com longo tempo de meia-vida para que possa ser administrado com maior intervalo entre as doses, melhorando a adesão ao tratamento, apresentar baixa interação com anti-retrovirais e baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas (BUDHA *et al.*, 2008).

No caso de fármacos com a farmacocinética já estabelecida, mudanças em formas farmacêuticas ou excipientes podem levar a modificação da farmacocinética da droga, uma vez que podem alterar parâmetros relacionados à absorção, distribuição e excreção. Neste sentido, os sistemas nano e micro estruturados tem conseguido alterar a farmacocinética de medicamentos anti-TB, prolongando a permanência dos fármacos no organismo, com aumento da eficácia terapêutica. O propósito é levar ao aumento da concentração do fármaco no sítio de ação, principalmente com a administração local destes dispositivos. Com isto, busca-se melhorar a posologia do tratamento, a sua eficácia, reduzir efeitos adversos e aumentar a adesão ao tratamento pelos pacientes, aumentando os índices de cura e minimizando o aparecimento da resistência bacteriana (BLASI *et al.*, 2009; PANDEY e AHMAD, 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- Isoniazida - ácido 4-piridinocarboxílico hidrazida (> 99%) (Sigma-Aldrich);
- JVA, Ácido *E-N²-3,7-dimetil-2-E,6-octadienilidenil* isonicotínico hidrazida, o qual foi sintetizado por Almeida e colaboradores (> 98%);
- PLGA - ácido poli(D,L-lático-co-glicólico) Resomer[®] RG 502H; 50:50; P. M. 7.000- 17.000 Da (Boehringer-Ingelheim);
- PVA - álcool polivinílico, P. M. 31.000 Da; grau de polimerização 630, parcialmente hidrolizado (86,7 - 88,7%) (Sigma-Aldrich);

3.1.2 Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau de pureza analítica (P.A.) ou superior como aqueles utilizados nas análises cromatográficas, que possuíam grau de pureza para CLAE.

- Acetonitrila para CLAE (J. T. Backer);
- Ácido clorídrico 37% P. A. (Merck);
- Ácido fosfórico 85% P. A. (Merck);
- Água Milli-Q (Sistema de Água Ultrapura - Milli-Q Plus - Millipore);
- Antibióticos: Estreptomicina (10.000 µg/mL) / Penicilina (10.000 U/mL) (Difco);
- Anti-fading (Molecular Probes);
- Cloreto de potássio P. A. (Sigma -Aldrich);
- Cloreto de sódio P. A. (Sigma -Aldrich);
- Clorofórmio P. A. (Synth);
- DAPI (4'-6- diamino-2-fenilindol) (Molecular Probes);
- Diclorometano, grau CLAE (Vetec);
- Dimetilsulfoxido (DMSO) P. A. (Merck);
- EDTA tetrasódico - ácido etilenodiamino tetra-acético P. A. (Sigma -Aldrich);

- Enriquecimento OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) (Difco);
- Etanol absoluto (Synth);
- Fosfato de potássio dibásico para CLAE (K_2HPO_4) (J. T. Backer[®]);
- Fosfato de potássio monobásico para CLAE (KH_2PO_4) (Merck[®]);
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (J. T. Backer);
- HEPES (tampão) (Gibco);
- Heparina 5.000UI/0,25 mL (Cristália);
- Hidróxido de potássio P. A. (Merck);
- Isotiocianato de fluoresceína (Sigma- Aldrich);
- L- glutamina (Gibco);
- Meio DMEM (LGC Biotecnologia);
- Meio líquido Middlebrook 7H9 Broth (Difco);
- Meio LJ - Löwenstein-Jensen (Laborclin);
- Monooleato de sorbitano polioxietilenado (Tween 20, Delaware);
- MTT – brometo 3 - (4,5 –dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio (Amresco);
- N- butanol para CLAE (Vetec);
- N,N-dimetilformamida pH 4,7 (Amresco);
- Paraformaldeído (Sigma – Aldrich);
- PBS estéril pH 7,2 (Gibco);
- Piruvato de sódio (Gibco);
- SDS - Dodecil sulfato de sódio (Nuclear);
- Solução fisiológica 0,9% (Glicolabor);
- Soro fetal bovino (Hyclone);
- Tripsina/EDTA 0,05% (Gibco).

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético 78HW-1 (Biomixer);
- Agitador multipontos - Shaker (DIST);
- Balança analítica A UW220D (Shimadzu);
- Capela de fluxo laminar (Veco);
- Centrífuga Mini-Spin (Eppendorf);
- Centrífuga para tubos (Eppendorf);
- Citômetro de fluxo FACSCanto[®] II (Becton-Dickinson);

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo AllianceBIO[®], (Waters Co.);
- Evaporador rotatório (Quimis);
- Granulômetro à laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments);
- Incubadora Innova CO-170 (New Brunswick Scientific);
- Leitor de placas Infinite M200 (TECAN);
- Microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems);
- Microscópio de Força Atômica SPM-9600 (Shimadzu);
- Microscópio eletrônico de varredura XL 30 (Philips);
- Potenciômetro, pHmetro (Quimis);
- Sonda de ultrassom (Unique);
- Ultracentrífuga Primac CR 20B2 (Hitachi);
- UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha);
- Ultra-Turrax[®], com elemento dispersor S25N-10G (IKA);
- Vórtex (Gilson).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Estudo da interação entre nanopartículas poliméricas e macrófagos infectados. Análise por citometria de fluxo e microscopia confocal.

3.2.1.1 Preparação de nanopartículas de PLGA contendo JVA

As nanopartículas (NPs) poliméricas de PLGA foram preparadas pela técnica da nanoprecipitação (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012). O preparo de NPs de JVA foi assim realizado: 10,0 mg de JVA foram pesados e solubilizados em 2,0 mL de etanol absoluto. Esta solução de JVA foi incorporada em uma fase orgânica contendo 45,0 mg de PLGA dissolvidos em 3,0 mL de diclorometano e homogeneizada com o auxílio de vórtex. Esta mistura foi vertida lentamente em 10,0 mL de uma solução aquosa de PVA a 1%, e em seguida emulsionada através de sonicação em sonda de ultrassom a 50 W durante 4 minutos. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e o volume final foi ajustado para 9,0 mL. A suspensão final foi centrifugada a 30.900 x g por 1 h a 4°C e o precipitado contendo as nanopartículas foi lavado três vezes com água para injeção. A quantificação do fármaco incorporado as NPs foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme metodologia

descrita detalhadamente abaixo no item 3.2.5.1.2. Após o preparo, as nanopartículas foram acondicionadas a -20 °C.

As nanopartículas sem fármaco, também chamadas de NPs brancas, foram produzidas empregando o mesmo procedimento descrito acima. Para a preparação de nanopartículas fluorescentes, adicionou-se 2,0 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC) à fase etanólica, sendo o restante da preparação realizada da mesma maneira.

3.2.1.2 Obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos

Macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMM's) foram obtidos conforme metodologia descrita por BAFICA *et al.*, (2005). Camundongos da linhagem “black C57BL/6” foram sacrificados e tiveram suas patas traseiras dissecadas e os ossos, fêmur e tíbia removidos. Na capela de fluxo laminar, as extremidades destes ossos foram cortadas e em seguida, utilizando-se uma seringa, os conteúdos medulares dos ossos foram lavados com meio de cultura DMEM estéril e antibiótico. Esta suspensão de células foi centrifugada a 1.000 x g por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 30 mL de meio DMEM completo (10% soro bovino fetal + 2 mM de L-glutamina + antibiótico Estreptomicina/Penicilina 1:100 + Piruvato de sódio 1:100 + 10 mM HEPES) com 20% de sobrenadante de células L929. As células foram distribuídas em placa de 6 poços, contendo 5,0 mL por poço, e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. No 5º dia de cultivo, foram adicionados 2 mL de DMEM completo e 20% de sobrenadante de L929 por poço e incubadas novamente. No 7º dia de cultivo, os macrófagos diferenciados foram lavados para remoção das células não-aderentes e na sequência adicionado 2 mL de tripsina/EDTA a 0,05% por poço para destacá-los da placa. As células foram transferidas para um tubo de 50 mL e centrifugadas a 1.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células foi ressuspenso em meio DMEM completo sem antibiótico e o volume ajustado para se obter uma concentração de 10⁶ células/mL. Foram adicionados 500 µL desta suspensão em cada poço de uma placa de 24 poços. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Em seguida foram realizados os experimentos de citometria de fluxo e microscopia confocal descritos no item 3.2.1.3 e 3.2.1.4.

3.2.1.3 Citometria de fluxo

BMM's foram infectados com *M. bovis* BCG cepa Pasteur, a qual expressa uma proteína fluorescente vermelha dsRed1 (BCG-RFP) (ABADIE et al., 2005), (MOI = 10) adicionando-se 10 μ L (3×10^8 bactérias/mL) da suspensão bacteriana. Após 3 h de incubação, as células foram lavadas com PBS estéril (pH 7,2) para retirar as bactérias que não foram fagocitadas e então adicionou-se 200 μ L de DMEM e 100 μ L de NPs FITC ou brancas que estavam ressuspensas em DMEM e as células foram incubadas por mais 2 h. Decorrido este tempo, os macrófagos foram lavados novamente com PBS e destacados da placa com auxílio de uma haste, coletados em tubo e ressuspensos em tampão (PBS + 1% soro bovino fetal) com 1% de paraformaldeído.

Os eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD) e analisados através do programa computacional FlowJo 8.6.3. Para analisar a associação das NPs com células infectadas, populações celulares foram definidas de acordo com tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e em seguida foi realizada a análise dos eventos positivos para FL-2 (RFP-BCG) vs. SSC. Células FL-2+ foram selecionadas e a expressão do FL-1 (FITC-NP) foi analisada através de histogramas. Em todos os experimentos realizados, células infectadas não tratadas ou expostas à NPs brancas foram utilizadas como controle negativo para definir a formação dos gates.

3.2.1.4 Microscopia confocal

BMM's (5×10^5 células/mL) aderentes a lamínulas foram infectadas com BCG-RFP (MOI = 1) e incubadas por 3 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período as células foram lavadas 3 vezes com DMEM e expostas a NP- FITC e novamente incubadas por 1 h sob as mesmas condições. As células foram lavadas com PBS e coradas com corante fluorescente DAPI e *anti-fading* para preservar a fluorescência.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (Leica Microsystems) e as células representativas foram selecionadas e uma série de secções ópticas (secções -z) foi registrada. Imagens capturadas nos canais do DAPI, proteína vermelha florescente (RFP) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram sobrepostas para determinar a colocalização das NPs-FITC com as BCG-RFP no meio intracelular.

3.2.2 Estudos da associação entre nanopartículas poliméricas e *Mycobacterium* por citometria de fluxo, microscopia de força atômica e MALDI-TOF/MS

3.2.2.1 Citometria de fluxo

Para os ensaios de citometria de fluxo utilizaram-se NPs-FITC e NPs brancas. Assim, 100 μL de uma suspensão bacteriana de *Mtb* H37Rv (10^6 bactéria/poço) cultivada em meio LJ, suplementado com 10% OADC, foi adicionado a tubos de 15 mL (tipo Falcon, BD) e expostas a 20 μL de uma suspensão que continham NPs FITC ou brancas por 4 h a 37°C. Transcorrido este tempo a suspensão foi centrifugada a $3.000 \times g$ por 10 minutos e lavada três vezes com PBS estéril para remover as NPs não associadas. Após este procedimento, as bactérias foram ressuspensas em tampão (PBS + 1% soro bovino fetal) contendo 4% de paraformaldeído. Todo o procedimento, exceto a leitura das amostras no citômetro, foi realizado em cabine de segurança biológica.

A análise no citômetro de fluxo foi realizada como descrito no item 3.2.1.3. Para a análise do *Mtb*, as populações celulares foram primeiramente definidas de acordo com o tamanho (FSC) e granulidade (SSC) e em seguida, foi realizada a análise de FL-1 (FITC-NP) vs. SSC. Em todos os experimentos, *Mtb* não expostos as NPs foram utilizados como controle negativo para definir a formação dos gates.

3.2.2.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para os estudos de AFM, 500 μL de uma suspensão bacteriana de *M. bovis* BCG (2×10^4 bactéria/mL) foi incubada com 500 μL de NP-JVA (200 $\mu\text{g/mL}$) ou NPs branca por diferentes tempos a 37°C, em atmosfera de 5% CO_2 . Após este período de incubação, a suspensão foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 min. e lavada 3 vezes com água Milli-Q. O precipitado foi ressuspenso em 1,0 mL de água Milli-Q e as amostras foram preparadas pipetando-se 20 μL em lamínulas.

As imagens foram adquiridas em um microscópio de força atômica (AFM) utilizando o modo de operação dinâmico/fase com uma haste (cantilever) de 125 μm de comprimento (constante de mola de $\sim 42 \text{ N/m}$, frequência de ressonância de $\sim 250 \text{ kHz}$) acoplada a ponteiros cônicas (raio de curvatura $< 10 \text{ nm}$). As imagens foram adquiridas com

uma resolução de 512 x 512 linhas a uma frequência de varredura de 1,0 Hz. Todas as imagens foram processadas utilizando o programa computacional SPM-9600 (Shimadzu). O processamento consistiu em um nivelamento global automático e as imagens visualizadas como representações bidimensionais (fase-viscoelasticidade) e tridimensionais (altura-topografia), as quais foram utilizadas para obtenção de medidas de altura assim como determinar a viscoelasticidade relativa das nanopartículas associadas às micobactérias.

3.2.2.3 MALDI-TOF/MS

Para os estudos utilizando MALDI-TOF/MS, 500 µL de uma suspensão bacteriana de *M. bovis* BCG (2×10^4 bactéria/mL) foram incubadas com 500 µl de NP-JVA (200 µg/mL) e controles (NPs brancas, JVA solúvel). Depois de 1 h esta suspensão foi lavada com água Milli-Q, centrifugada ($10.000 \times g$ por 10 min) e após ressuspensão em água, as amostras foram aplicadas sobre um filtro de porosidade 0,45 µm (Millipore, USA) (Fig. 4). Após lavagens exaustivas (cerca de 30 vezes), a membrana filtrante foi retirada do filtro e após o preparo das amostras analisada por MALDI-TOF/MS. Para isso, as membranas contendo o material retido ou placebo foram colocadas em tubos plásticos e misturadas a uma solução saturada de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico e 0,5 µL de amostra aplicados em triplicata em uma placa MALDI MTP AnchorChip var/384.

A massa molecular monoisotópica de JVA foi determinada por MALDI-TOF/MS utilizando um equipamento UltraFlex III (Bruker Daltonics, Germany) controlado pelo software FlexControl 3.0. Para a quantificação do íon JVA, foi calculada a razão entre o íon correspondente ao JVA (m/z 272) e o principal íon da matriz (m/z 379). O espectro de massa foi obtido em modo refletido e positivo com o laser na frequência de 100 Hz sendo que foi realizada uma calibração externa com os íons da matriz. Os dados foram analisados utilizando o software FlexControl 3.0.

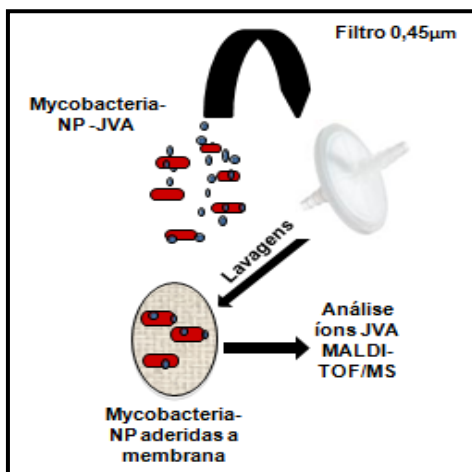


Figura 4: Figura esquemática ilustrando o experimento realizado com MALDI-TOF/MS.

3.2.3 Obtenção do perfil farmacocinético de JVA em plasma de camundongos após administração pelas vias oral e intraperitoneal

3.2.3.1 Animais

Camundongos da linhagem “black C57BL/6”, fêmeas e machos com idade entre 6 e 8 semanas foram utilizados neste experimento. Os animais foram alimentados em regime *ad libitum* e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h a temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2$. Todos os experimentos que utilizaram animais neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob protocolo PP 00517 (Anexo 1).

3.2.3.2 Preparação do JVA para administração

Devido ao fato do JVA ser um composto com baixa solubilidade em água, hidrofóbico, não foi possível solubilizá-lo completamente para a administração intravenosa. Desta forma, optou-se pela administração sistêmica pela via intraperitoneal (IP) e também pela via oral (VO). Para o preparo do fármaco, foi feita uma suspensão de JVA na concentração de 10,0 mg/mL. Assim, pesou-se 80 mg de JVA e solubilizou-se com 800 µL de etanol absoluto (10%). Após, acrescentou-se 800 µL de Tween 20 (10%) e finalmente PBS pH 7,4 até completar o volume de

8,0 mL. Neste processo a homogeneização com auxílio de vórtex foi contínua. O JVA foi preparado diariamente durante os experimentos.

3.2.3.3 Protocolo Experimental

Camundongos foram pesados e separados em 10 grupos experimentais (6 animais por grupo/IP e 5 animais por grupo/VO). Para ambas as vias, os grupos eram controle, no qual foi administrado somente o veículo, e teste, nos quais foram administrados JVA na dose de 50,0 mg/Kg através de injeção IP e por gavagem para VO. Como a solução de JVA estava na concentração de 10,0 mg/mL, administrou-se 0,05 mL para cada 10 g de peso do animal.

Os tempos de coleta para VO foram de 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 min, e para via IP foram de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 e 90 minutos. Nestes tempos, cada animal foi anestesiado com o anestésico inalatório Isoflurano e coletado sangue através de punção cardíaca, ocorrendo a morte do animal em função da coleta. As amostras de sangue foram vertidas em microtubos de plástico contendo 20 µL de heparina (100 UI/mL) e mantidas em gelo. Em seguida foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo o plasma removido, separado em alíquotas de 100 µL e estocado a -80°C até serem analisadas. Após a coleta do sangue, os animais foram perfundidos com 10 mL de salina e os órgãos foram coletados, dissecados e armazenados em placas de cultura de 12 poços, sendo posteriormente congelados a -80°C.

3.2.3.4 Análise das amostras de plasma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a dosagem de JVA em plasma foi necessário o desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE. Utilizou-se para este fim um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Waters, modelo AllianceBIO® (Waters Co.), equipado com uma bomba quaternária, desgaseificador, aquecedor de coluna, injetor automático refrigerado e detector UV/VIS de arranjo de fotodiodos (PDA), modelo Waters 2998, todos controlados *online* pelo programa Empower® 2 para aquisição e processamento dos registros cromatográficos.

As amostras foram injetadas em uma coluna de fase-reversa, C-18, marca ACE® (ACT – Reino Unido) (150 mm de comprimento, 3,0 mm diâmetro interno e partículas de 3 µm de diâmetro). O sistema foi

operado a 25°C utilizando como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, na proporção 55:45 (v/v), com fluxo isocrático de 0,2 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O tampão fosfato foi preparado com água Milli-Q através da mistura de tampão fosfato de potássio monobásico e dibásico, ambos a 100 mM, até o ajuste do pH em 6,0 e filtrada em membrana de 0,45 µm de porosidade. Os picos foram detectados pela absorbância da luz ultravioleta em 305 nm. Os registros cromatográficos foram adquiridos e processados pelo programa Empower 2 (Waters Co.).

Tanto para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica, bem como para a posterior quantificação das amostras obtidas nos ensaios *in vivo*, curvas de calibração em plasma obtido de animais não tratados, denominado plasma branco, foram construídas, através da contaminação de alíquotas de plasma com concentrações conhecidas do analito. Para este objetivo, soluções estoque dos padrões analíticos foram preparadas pesando-se exatamente 10 mg de JVA e solubilizando em 10 mL de acetonitrila, resultando em uma solução com 1,0 mg/mL. A partir dessa solução, diluições sucessivas foram preparadas nas concentrações de 100, 50, 30, 20, 10, 5, 2,5 e 1,0 µg/mL e armazenadas em geladeira.

O preparo das curvas de calibração a partir da contaminação de plasma branco foi feita da seguinte maneira: 100 µL de plasma foram separados em microtubos de plástico e acrescentados 10 µL de cada solução padrão previamente preparada como descrito acima. Após homogeneização leve, estas amostras foram congeladas a - 80°C para serem processadas em outro momento. As concentrações das curvas foram de 100, 250, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 e 10.000 ng/mL de JVA.

Para extração de JVA das amostras de plasma, tanto para aquelas contaminadas com os padrões como para as que foram obtidas em experimentos *in vivo* empregou-se como método de extração a precipitação de proteínas com acetonitrila (Esquema Fig. 5). A extração foi realizada em microtubos de plástico de 1,5 mL, que continham 100 µL de plasma sobre os quais foram acrescentados 500 µL de acetonitrila seguidos de agitação vigorosa por cerca de 30 segundos com auxílio de vórtex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4.000 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. Na sequência, coletou-se o sobrenadante em outro tubo, o qual foi submetido à evaporação em banho-maria a 37°C sob corrente suave de nitrogênio. Após a evaporação completa, o resíduo foi reconstituído com 100 µL de fase-móvel e agitado vigorosamente com vórtex por cerca de 1 min. Por fim,

as amostras foram centrifugadas novamente a $12.100 \times g$ por 15 min., coletou-se o sobrenadante de cada amostra e 20 μL foram injetados no cromatógrafo.

A partir disso, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear baseada no método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo “**x**” as diferentes concentrações das soluções padrões versus a área dos picos do analito JVA obtidas pela absorção no UV após a extração do plasma, lançadas no eixo “**y**”. Para o cálculo das concentrações de JVA nas amostras obtidas nos experimentos *in vivo* empregou-se a equação $y = ax + b$, onde **x** é a concentração da droga no plasma (ng/mL) e **y** é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, **a** é a inclinação da reta e **b** o valor do intercepto.

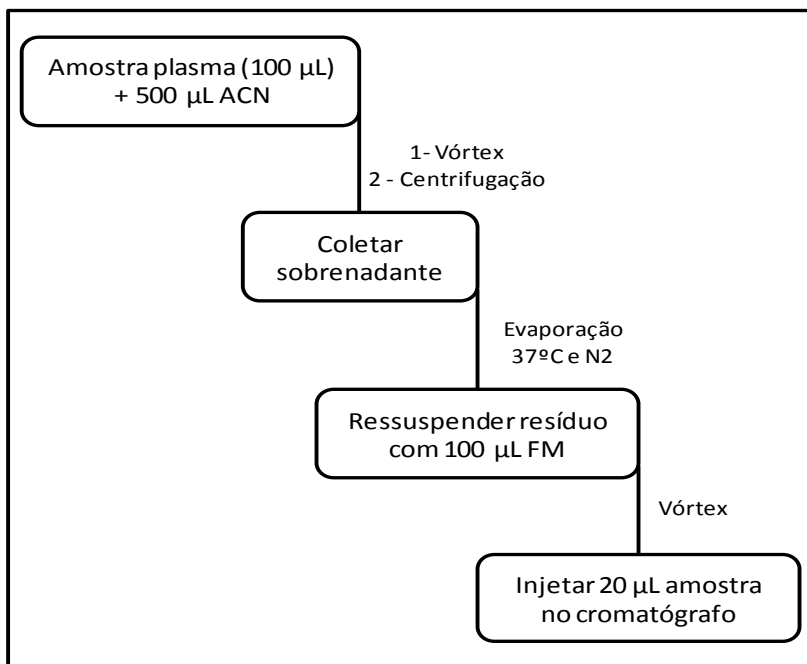


Figura 5: Fluxograma da extração de JVA das amostras de plasma.

3.2.3.4.1 Validação do método analítico

Durante o desenvolvimento de uma metodologia analítica é importante obtermos dados confiáveis e reprodutíveis. Para isso, é

realizada uma validação prévia da metodologia que visa conferir credibilidade aos dados gerados, de modo a garantir que estes expressem o valor real da medida obtida.

A validação do método cromatográfico envolveu ensaios de repetibilidade (intraensaio) e reprodutibilidade (interensaio), levando em consideração a análise dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limites de detecção e quantificação e estabilidade. (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Para o ensaio de seletividade, amostras de plasma branco, obtidas de animais não tratados, foram comparadas àquelas que foram contaminadas com os padrões de concentrações conhecidas de JVA, após terem passado pelo mesmo processo de extração descrito acima. Para o método ser considerado seletivo, não deveria haver interferentes do plasma branco no mesmo tempo de retenção do analito (SHAH *et al.*, 2000).

A linearidade foi avaliada através da construção de curvas de calibração obtidas após a contaminação de plasma branco com concentrações conhecidas do analito. Após a extração das amostras e eluição no sistema cromatográfico, curvas de área dos picos do analito em função da concentração foram plotadas e a equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados por regressão linear. A linearidade foi expressa através do coeficiente de correlação linear cujo valor para amostras biológicas deve ser maior que 0,98 (BRASIL, 2003).

A precisão do método foi determinada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV %) do interensaio e do intraensaio. Para ambas as análises, amostras de plasma branco foram contaminadas com concentrações conhecidas de padrão, em concentrações consideradas baixa, intermediária e alta em relação à curva de calibração, sendo essas concentrações de 100, 1.000 e 5.000 ng/mL. O interensaio foi realizado em dias consecutivos, analisando-se amostras em triplicatas, calculando-se as concentrações obtidas, após a precipitação com acetonitrila, pela equação da reta construída a partir das curvas de calibração processadas diariamente da mesma forma que as amostras de validação. A variabilidade expressa pelo coeficiente de variação (CV) foi calculada como sendo o Desvio Padrão (DP) / Média x 100. Para um método ser considerado preciso o valor do CV deve ser inferior a 15% e para amostras próximas ao limite de detecção este valor pode chegar a 20%. De modo similar, para o intraensaio, amostras em quintuplicatas foram processadas e analisadas da mesma forma (BRASIL, 2003).

A exatidão, expressa em porcentagem (%) foi calculada para o intraensaio e interensaio, para cada amostra das 3 concentrações processadas, sendo calculada como concentração obtida (ng/mL)/concentração adicionada (ng/mL) x 100.

Para o cálculo da recuperação, os padrões utilizados para a contaminação das amostras de plasma do intraensaio também foram analisados por CLAE e a recuperação foi calculada da seguinte forma:

$$R(\%) = \frac{A_{ap}}{A_{pp}} \times 100$$

onde R= recuperação em %; A_{ap} = Área do pico de JVA da amostra extraída do plasma; A_{pp} = Área pico do padrão de JVA.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados utilizando as curvas de calibração do interensaio. Estes parâmetros foram calculados com as seguintes equações, respectivamente: $10 \times \sigma \times S^{-1}$ e $3,3 \times \sigma \times S^{-1}$, onde S é a inclinação da curva de calibração e σ é o desvio padrão do intercepto y da equação de regressão linear (BRASIL, 2003).

A estabilidade do JVA em solução e nas amostras de plasma contaminadas foram testadas frente a 3 ciclos de congelamento/descongelamento, luz UV e calor. Para isso, alíquotas do mesmo padrão (1.000 ng/mL) e amostras de plasma contaminadas, foram separadas e submetidas ao congelamento/descongelamento, luz UV a temperatura ambiente por 1 hora e calor de 45°C por 30 minutos. Para a análise da estabilidade dos padrões compararam-se as áreas obtidas entre a análise dos picos das amostras que ficaram em geladeira com aquelas submetidas às diferentes condições teste. No caso das amostras de plasma, após a extração pela metodologia citada acima, também foi feita uma relação entre as áreas obtidas pelas amostras que foram mantidas congeladas em - 80° C (condição de armazenamento padrão) e aquelas submetidas às condições teste. A razão foi multiplicada por 100 para expressar a estabilidade em %.

3.2.3.5 Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos

Curvas da concentração plasmática da droga em função do tempo foram construídas lançando-se no eixo y as concentrações de JVA encontradas após análise das amostras por CLAE e no eixo x os tempos em que as amostras foram coletadas. A concentração plasmática máxima observada (Cmax) e o tempo necessário para atingi-la (Tmax), foram

obtidos através da curva. Para o cálculo dos demais parâmetros utilizou-se o programa computacional PharmKit, de uso livre.

A área sob a curva da concentração da droga versus tempo de zero ao infinito foi calculada através do método trapezoidal. A constante de eliminação terminal (k_{el}) foi estimada pelo cálculo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se as concentrações que compõe a fase de decaimento terminal. O tempo de meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi derivado da k_{el} , onde $t_{1/2} = \ln 2 / k_{el}$, ou seja, 0,693/k. Os valores da depuração (Cl) foram obtidos dividindo-se a dose pela AUC e multiplicando-se pelo F_R para a correção da dose no caso da via oral. A biodisponibilidade relativa (F_R) foi obtida dividindo-se a AUC encontrada para a via oral pela AUC da via IP. O volume aparente de distribuição (Vd) foi obtido dividindo-se a taxa de depuração pela constante de eliminação (k_{el}).

3.2.4 Obtenção do perfil farmacocinético de JVA encapsulado em nanopartículas em plasma de camundongos após administração intraperitoneal

Para a administração das nanopartículas de JVA pela via intraperitoneal, estas foram ressuspensas em salina na concentração de 5,0 mg/mL. Para isto, levou-se em consideração a quantidade de JVA, em mg, contida em cada formulação e se ressuspendeu, homogeneizando a formulação com auxílio de vórtex, no volume necessário para obter a concentração desejada.

Para obtermos um perfil farmacocinético preliminar do JVA encapsulado em nanopartículas, realizou-se um experimento piloto, seguindo o protocolo descrito no item 3.2.3 com algumas alterações nos grupos experimentais e tempos de coleta. Neste caso, os camundongos foram separados em 5 grupos experimentais (4 animais por grupo). Os grupos eram controle, no qual foi administrado nanopartículas brancas, isentas de JVA, e teste, nos quais foram administrados NPs de JVA na dose de 50,0 mg/Kg pela via intraperitoneal. Como a solução de JVA estava na concentração de 5,0 mg/mL, administrou-se 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal, sendo as coletas realizadas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min.

A quantificação das amostras em plasma foi realizada com a mesma metodologia cromatográfica descrita em 3.2.3.4.

3.2.5 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos de JVA encapsulado em micropartículas poliméricas de PLGA administrados em camundongos pelas vias oral e intraperitoneal

Para a realização dos ensaios farmacocinéticos utilizando micropartículas (MPs) de JVA, estas foram preparadas e caracterizadas quanto a sua morfologia, tamanho e teor de JVA. Também, realizou-se um estudo de liberação *in vitro* destas partículas em três meios de liberação distintos.

Após estes estudos de caracterização, MPs de JVA foram utilizadas em ensaios para avaliar a atividade antimicobacteriana do JVA encapsulado neste tipo de carreador em cepa padrão de *Mtb* (H37Rv) e a seguir realizou-se a administração destas partículas pelas vias intraperitoneal e oral para a análise farmacocinética do JVA encapsulado em MPs, como descrito no item 3.2.3.

3.2.5.1 *Preparação, caracterização e avaliação da atividade antimicobacteriana de micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA*

3.2.5.1.1 Preparação de micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA

Micropartículas (MPs) poliméricas de PLGA foram obtidas através da técnica de emulsificação simples com evaporação do solvente adaptada de DUTT e KHULLER, (2001b).

Inicialmente, 100 mg do polímero PLGA foram pesados e dissolvidos em 10 mL de diclorometano (fase orgânica). Com o objetivo de otimizar a quantidade de fármaco incorporado às MPs, foram preparadas soluções etanólicas de JVA em diferentes concentrações (10; 20; 25 e 40 mg/mL) e 2 mL de cada solução foi adicionada à fase orgânica e homogeneizada com auxílio de vórtex. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, esta fase orgânica, contendo o JVA e o polímero, foi adicionada a um béquer que continha 60 mL de uma solução de PVA 1% (p/v) (fase aquosa) e emulsionado por 5 min com Ultra-Turrax® a 13.500 rpm. A emulsão formada foi mantida sob agitação magnética durante a noite para evaporação do solvente orgânico (Fig. 6). No dia seguinte, coletou-se uma alíquota da suspensão total (ST) e a formulação foi centrifugada a 3.000 x g a 4°C por 20 minutos, coletando-se também os sobrenadantes. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para lavar as partículas com água Milli- Q a fim de

retirar o excesso de JVA e do tensoativo. As formulações foram avaliadas quanto ao teor de JVA ($\mu\text{g/ml}$), a eficiência de encapsulação (%) e a taxa de recuperação (%).

Micropartículas sem JVA, também chamadas de MPs brancas foram preparadas seguindo o mesmo procedimento apresentado acima.

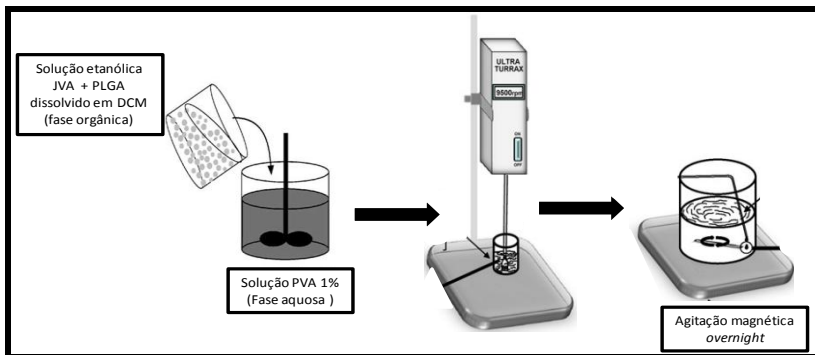


Figura 6: Esquema de preparação de micropartículas de PLGA contendo JVA (**PLGA:** ácido poli (D,L, láctico-co-glicólico); **JVA:** Ácido *E-N*²-3,7- dimetil-2-E,6-octadienilidenil isonicotínico hidrazida ; **DCM:** diclorometano; **PVA:** álcool polivinílico).

3.2.5.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação das micropartículas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação de JVA nas micropartículas, adaptou-se a metodologia por CLAE descrita por CALLERI *et al.*, (2002) com algumas modificações. Inicialmente, esta metodologia foi utilizada para quantificar isoniazida, contudo devido às diferenças físico-químicas encontradas entre a INH e JVA, adaptações foram feitas em relação à fase móvel e o comprimento de onda de absorção máxima no UV. As análises foram realizadas no mesmo cromatógrafo AllianceBIO® (Waters Co.).

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa, modelo Luna recheada com sílica ligada a um polímero (octadecilssilano), C18 (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex, USA), contendo partículas de 5 μm de diâmetro, protegida por uma guarda-coluna de mesmo material. A fase móvel foi composta por uma mistura de acetonitrila (ACN) e tampão fosfato 50 mM pH 6,0; 65:35 (v/v), com

fluxo isocrático de 1,0 mL/min a 25° C. O volume de injeção foi de 20 µL e a detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 298 nm.

Para a quantificação do JVA nas MPs, uma curva de calibração com o padrão foi construída com concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 µg/mL. Para isso, 10 mg de JVA foram pesados e solubilizados em 10 mL de acetonitrila, tendo uma solução padrão estoque de 1,0 mg/mL. A partir desta solução, diluições seriadas foram feitas em fase móvel e injetadas no cromatógrafo para a obtenção da curva de calibração. As áreas dos picos obtidas para as soluções dos padrões de calibração foram plotadas em função das concentrações e analisadas por regressão linear obtendo-se a equação da reta para o cálculo das amostras desconhecidas. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de correlação linear cujo valor deve ser superior a 0,995.

O doseamento de JVA nas MPs foi realizado na suspensão total (ST), nos sobrenadantes coletados após as lavagens e no precipitado de MPs. Para isto, 100 µL de ST foram dissolvidas com 400 µL de ACN: DMSO (50:50), rediluídos 1:10 em fase móvel (FM) e 20 µL foram injetado no cromatógrafo. A quantificação dos sobrenadantes foi feita após estes serem diluídos 1:10 em FM e injetado 20 µL. Para a quantificação do precipitado de MPs retirou-se uma alíquota da suspensão obtida após as lavagens das MPs descrita no item 3.2.5.1. Para isso, as partículas foram ressuspensas em 10 mL de água Milli-Q e uma alíquota de 1 mL foi separada e centrifugada a 12.100 x g por 10 min para separar as MPs do sobrenadante. Descartou-se o sobrenadante e as partículas contidas no precipitado foram rompidas com 1,0 mL de acetonitrila, agitadas com vórtex, diluídas 1:20 em FM e 20 µL foram injetados no cromatógrafo. Para o cálculo das concentrações de JVA, as áreas dos picos obtidas das amostras desconhecidas foram calculadas pela equação da reta, obtida anteriormente pela injeção das soluções da curva de calibração. Para tanto foram consideradas as diluições realizadas e os volumes iniciais para a obtenção da massa de JVA, em mg, contida na formulação.

A eficiência de encapsulação (%) foi calculada pela razão entre a massa de JVA (mg) dosada no precipitado da formulação e a massa total adicionada no início do processo multiplicada por 100. O teor da formulação foi dado em µg/mL, isto é, massa de JVA em µg por mL de formulação. A taxa de recuperação foi calculada considerando-se a massa recuperada na ST dividido pela massa adicionada inicialmente e multiplicada por 100.

3.2.5.1.3 Caracterização Morfológica das Micropartículas poliméricas de PLGA

As micropartículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio, distribuição granulométrica e morfologia. Esses ensaios também foram conduzidos nas MPs brancas, isto é, naquelas livres de JVA para verificar se a incorporação do fármaco no sistema carreador não alterou as características de tamanho e morfologia das partículas.

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica das partículas foram determinadas por difração a laser em um granulômetro a laser Mastersizer 2000, com luz monocromática vermelha de um laser de HeNe. As amostras foram dispersas em água Milli-Q com auxílio de vórtex e a configuração de análise pela teoria de Fraunhofer foi adotada, com índice de obscuração entre 9 e 11 %. Os resultados foram expressos pelo diâmetro do volume equivalente a 10 % (d10%), 50 % (d50%) e 90 % (d90%) do volume acumulado, além da medida de superfície média D[3,2].

A análise morfológica foi obtida através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise por MEV foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM – UFSC). As amostras foram diluídas cerca de 100 vezes e colocadas sob um filme de carbono fixado em um suporte metálico. Após a secagem, foram submetidas à metalização através do recobrimento com ouro, sob vácuo. A visualização foi realizada em aumentos de 2.000 a 4.000 vezes, com uma voltagem de excitação de 5 a 10 kV.

3.2.5.1.4 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de JVA a partir das micropartículas de PLGA em diferentes meios de liberação

Para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* das MPs de JVA, prepararam-se 3 meios de liberação distintos conforme metodologia descrita na Farmacopéia Americana (2009), sendo eles o fluido gástrico simulado, o fluido intestinal simulado e tampão fosfato. A preparação do fluido gástrico simulado pH 1,2 (FGS), foi realizada da seguinte maneira: em 500,0 mL de água foram solubilizados 2,0 g de cloreto de sódio, adicionados 7,0 mL de ácido clorídrico p.a e o volume completado com água para 1,0 L. O pH do meio foi ajustado para 1,2 mediante adição de solução de hidróxido de sódio 1,0 N. Para o preparo do fluido intestinal simulado pH 6,8 (FIS) foram solubilizados, em 250,0 mL de água, 6,8 g de fosfato de potássio monobásico, o pH da solução foi ajustado para 6,8 com uma solução de hidróxido de sódio

0,2 N e o volume completado com água para 1 L (USP 32). Tampão fosfato pH 7,4 foi preparado solubilizando-se 8,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, 1,44 g de fosfato de sódio dibásico e 0,24 g de fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água. Após a dissolução ajustou-se o pH para 7,4 com ácido clorídrico 9,0 N e completou-se o volume para 1,0 L.

Os perfis de liberação de JVA no FGS, FIS e PBS foram obtidos da seguinte maneira. Brevemente, diferentes formulações de MPs foram ressuspensas em água Milli-Q para que a concentração de fármaco ficasse em 1,0 mg/mL. Os meios de dissolução acrescidos de Tween 20 a 0,5% foram colocados em frasco erlenmeyer e após o estabelecimento das condições *sink* (concentração estabelecida que equivale a 10-30% da concentração de saturação da molécula em determinado meio), diferentes volumes de partículas foram acrescidos nos devidos recipientes até completarem 30,0 mL. Os frascos foram mantidos na temperatura de $37 \pm 0,5$ °C, com agitação controlada de 100 rpm.

Para a determinação do perfil de liberação de JVA nos diferentes meios de liberação, alíquotas de 500 µL foram retiradas nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada coleta, o volume removido foi repostado para manutenção das condições *sink*. As alíquotas foram centrifugadas durante 10 minutos a 12.100 x g coletando-se o sobrenadante para posterior análise.

Para a quantificação das amostras, utilizou-se metodologia por cromatografia descrita no item 3.2.5.1.2. A partir dos resultados, curvas de percentual de JVA liberado versus tempo foram construídas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.5.1.5 Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* de micropartículas de PLGA contendo JVA

Como triagem para a avaliação da viabilidade da cepa H37Rv de *Mtb* frente ao JVA livre ou encapsulado em MPs utilizou-se o método do MTT, adaptado de MSHANA *et al.*, (1998). Todo o procedimento, exceto a leitura da densidade óptica, foi realizado em cabine de segurança biológica. Para a confirmação da atividade antimicobacteriana, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placa de Petry contendo meio 7H10.

A suspensão do *Mtb* foi preparada a partir do crescimento em meio LJ, em fase exponencial de crescimento, em tubos contendo pérolas de vidro e meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC. Após agitação em vórtex e subsequente repouso, a concentração de bactérias

foi ajustada através da comparação da turbidez da suspensão bacteriana à turbidez do tubo nº1 da escala 1 de McFarland, equivalente à 3×10^8 bactérias/mL. A concentração final utilizada foi de 3×10^7 bactérias/mL.

Para o tratamento das culturas, foram preparadas soluções-mãe de JVA livre e encapsulado, na concentração de 1,0 mg/mL, em meio PBS pH 7,2. Em uma placa de 96 poços foram realizadas as diluições seriadas, a partir da solução estoque de fármaco, para obter as concentrações de: 0,2, 0,6, 1,2, 2,0, 6,0, 20,0, 60,0 e 200,0 μ M deste composto em meio 7H9 com volume final de 100 μ L. Foram adicionados 100 μ L da suspensão bacteriana, contendo 3×10^6 bactérias, aos 100 μ L de JVA já adicionados anteriormente, de modo a se obter as concentrações desejadas de: 0,1; 0,3; 0,6; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 μ M.

Como controle negativo foi utilizada a mesma concentração de bactérias inativadas termicamente, através do aquecimento a 100 °C durante 30 minutos, em banho-maria. Para o controle positivo, foram plaqueadas 3×10^6 bactérias por poço, sem adição de JVA. Poços contendo apenas meio 7H9 enriquecido com 10% de OADC foram utilizados como branco para as leituras. O esquema da placa utilizada nos ensaio de MTT, contendo as culturas de *Mtb* H37Rv com os diferentes tratamentos com JVA livre e microencapsulado, está representado na tabela a seguir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bactéria viva (Controle +)							100 μ M				
B	Bactéria Viva + MP							30 μ M				
C								10 μ M				
D	Bactéria morta (Controle -)							3 μ M				
E	MP branca							1 μ M				
F	JVA-MP							0,6 μ M				
G	JVA solúvel							0,3 μ M				
H	Meio (branco)							0,1 μ M				

Tabela 1- Esquema da placa de cultura utilizada no ensaio de MTT e contagem de UFC após tratamento de *Mtb* com JVA e MPs JVA. Controle positivo, *Mtb* H37Rv viáveis; Controle negativo, *Mtb* H37Rv inativadas termicamente; Branco: Meio 7H9 + MTT + tampão de lise; MP branca: Meio 7H9 + MTT + micropartículas brancas (placebo); JVA solúvel: diferentes concentrações do fármaco livre; JVA-MP: micropartículas poliméricas contendo diferentes concentrações de JVA.

Após o tratamento, as culturas bacterianas foram fechadas com parafilme e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%, durante 7 dias. Transcorrido este tempo de incubação, adicionou-se em cada poço 50 μ L de uma solução de MTT em PBS estéril pH 7,2 contendo 10% de Tween 80 na concentração de 1,0 mg/mL, sendo esta solução preparada no momento do uso.

Após a adição do MTT, a placa retornou para a incubação nas mesmas condições, durante 4 horas. Em seguida, em cada poço foram adicionados 50 μ L de tampão de lise contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50% de N,N-dimetilformamida a pH 4,7 para dissolução dos cristais de Formazan e inativação das bactérias. As placas foram incubadas por mais 12 horas, a 37°C.

A leitura final do teste foi baseada na visualização da mudança de cor do MTT, de amarelo (oxidada) para a cor púrpura (reduzida), o que foi relacionado com crescimento celular. A densidade óptica desta solução foi determinada na própria placa, através de leitor de placas em comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Para confirmar os resultados obtidos pelo método do MTT, amostras tratadas com as MPs foram semeadas em meio sólido 7H10. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a 37 °C, 5% CO₂. Após 28 dias de incubação, as colônias foram contadas na placa, e os resultados expressos graficamente.

3.2.5.2 Análise farmacocinética de JVA encapsulado em micropartículas poliméricas em plasma de camundongos após administração pelas vias oral e intraperitoneal

Para a administração das micropartículas de JVA pelas vias oral e intraperitoneal, estas foram ressuspensas em salina na concentração de 5,0 mg/mL. Para isto, levou-se em consideração a quantidade de fármaco, em mg, contida em cada formulação e se ressuspendeu, homogeneizando a formulação com auxílio de vórtex, no volume necessário para obtenção da concentração desejada.

O protocolo utilizado para este experimento foi o mesmo descrito acima no item 3.2.3 com algumas alterações nos grupos experimentais e tempos de coleta. Para o ensaio da via IP, camundongos foram separados em 10 grupos experimentais (5 animais por grupo), sendo este controle, no qual foi administrado MPs brancas, e testes, nos quais foram administrados JVA em MPs na dose de 50,0 mg/Kg pela via intraperitoneal. Como a solução de JVA estava na concentração de 5,0 mg/mL, administrou-se 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal, sendo as coletas realizadas nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Para a VO, os animais foram separados em 12 grupos experimentais (5 animais por grupo), sendo os tempos de coleta de 0, 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 24,0 e 48,0 hs.

A quantificação das amostras em plasma foi realizada com a mesma metodologia cromatográfica descrita em 3.2.3.4.

Os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos foram realizados da mesma forma como descrito acima no item 3.2.3.5.

3.2.6 Análise farmacocinética de isoniazida livre em plasma de camundongos após administração pela via oral

A partir de algumas observações feitas durante os experimentos, de que o JVA era convertido, pelo menos parcialmente, no seu precursor, a isoniazida (INH), resolvemos investigar a farmacocinética do JVA em relação à formação de INH. Para tal, uma metodologia de análise de INH em plasma teve de ser adotada, como segue. A isoniazida foi solubilizada em PBS pH 7,4, na concentração de 5,0 mg/mL no dia do experimento. Para isso, pesou-se 30 mg de INH e solubilizou-se com 6,0 mL de PBS agitando com auxílio de vórtex.

O mesmo protocolo experimental descrito no item 3.2.3 foi utilizado, porém com algumas alterações nos grupos experimentais e tempos de coleta. Camundongos da linhagem “black C57BL/6”, fêmeas e machos com idade entre 6 e 8 semanas foram utilizados neste experimento. Os animais foram pesados e separados em 8 grupos experimentais (5 animais por grupo). Os grupos eram controle, no qual foi administrado somente o veículo PBS, e testes, nos quais foram administrados INH na dose de 25,0 mg/Kg por gavagem (VO). Como a solução de INH estava na concentração de 5,0 mg/mL, administrou-se 0,05 mL para cada 10 g de peso do animal, sendo os tempos de coleta de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 h. Neste caso, as amostras de sangue foram vertidas em microtubos plásticos contendo 30 µL de EDTA sódico 7,5% (p/v) como anticoagulante.

3.2.6.1 Quantificação de INH em plasma de camundongo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A metodologia cromatográfica para dosagem de INH em plasma foi adaptada de Calleri *et al.*, (2002), com algumas adaptações. Brevemente, as amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido Alliance Bio[®], em uma coluna de fase reversa C-18, modelo XBridgeTM (Waters Co.) (150 mm x 4,6 mm d. i., 5 µm). O sistema foi operado à 25°C utilizando-se como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, na proporção de 3:97 (v/v), com fluxo isocrático de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL para os padrões e 40 µL para as amostras. Os picos foram detectados pela absorbância da luz ultravioleta em 264 nm.

Para a quantificação das amostras por CLAE, curvas de calibração foram preparadas como já descrito anteriormente com concentrações de 200, 300, 500, 1.000, 2000, 3.000, 5.000 e 10.000

ng/mL. As curvas foram obtidas a partir da contaminação de plasma branco e posterior processamento destas amostras.

A extração de INH das amostras dos padrões em plasma, como as que foram obtidas nos experimentos *in vivo* foram realizadas segundo Verma *et al.*, (2008) com algumas modificações (Fig. 7). Brevemente, em tubos de 2,0 mL, que continham 200 µL de plasma foram acrescentados 80 µL de uma solução de NaCl 20% (p/v) e agitado levemente com auxílio de vórtex. Em seguida, 1,0 mL de uma mistura de clorofórmio/butanol 70:30 (v/v) foi adicionado e homogeneizado vigorosamente por cerca de 1 min. Após esta etapa as amostras foram centrifugadas a 9.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo separado o sobrenadante (fase aquosa) em outro microtubo de 1,5 mL e a parte inferior (fase orgânica) em tubo plástico de 5,0 mL. Na sequência repetiu-se mais duas vezes esta extração com clorofórmio/butanol da fase aquosa e a fase orgânica resultante das extrações foi coletada no tubo plástico. Por fim, 400 µL de ácido fosfórico 30 mM foram acrescentados à fase orgânica e misturados vigorosamente com auxílio de vórtex por cerca de 1 min e centrifugados a 3.000 x g por 10 min a TA. Após esta centrifugação, 300 µL do sobrenadante que continha o ácido fosfórico foram coletados em outro microtubo e neutralizados com 5,0 µL hidróxido de potássio 5,0 N (p/v) e após agitação leve com vórtice submeteu-se estas amostras a nova centrifugação a 12.100 x g por 10 min. Então, injetou-se 40 µL de cada amostra no cromatógrafo.

A partir disso, curvas de calibração foram traçadas e as amostras foram calculadas através da equação da reta obtida da curva de calibração.

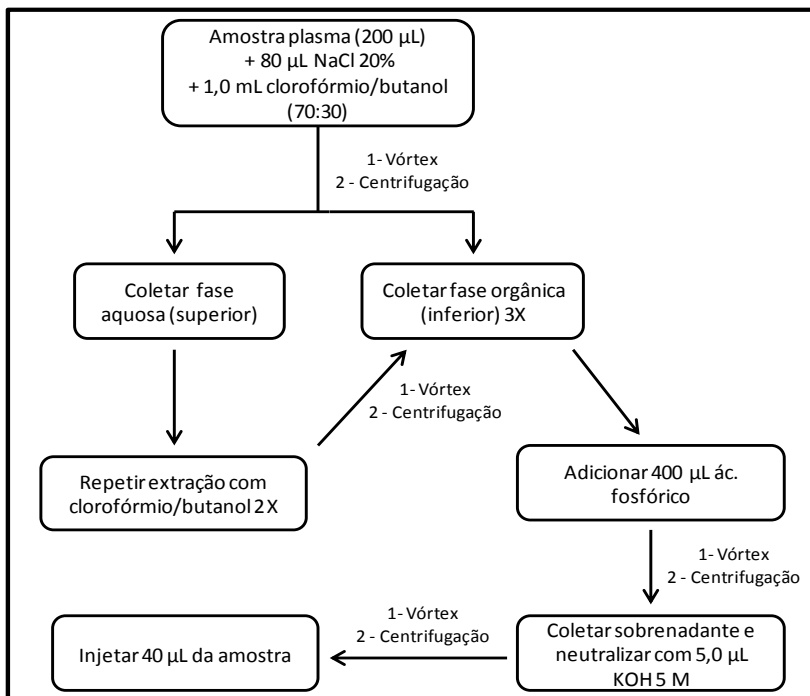


Figura 7: Fluxograma da extração de INH de amostras de plasma

Os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos foram realizados da mesma forma como descrito no item acima 3.2.3.5.

3.2.6.1.1 Validação parcial do método analítico

Como a metodologia empregada para a extração de INH a partir de amostras de plasma foi adaptada de Verma *et al.*, (2008), realizou-se uma validação parcial deste método cromatográfico para padronização das nossas condições experimentais. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e recuperação (BRASIL, 2003; SHAH *et al.*, 2000).

3.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da utilização do programa GraphPad Prism4® (GraphPad Software, Inc.). Comparações múltiplas para medidas não pareadas foram realizadas por ANOVA de

duas vias. Os níveis de significância foram determinados pelo teste de comparação múltipla através de *post hoc* de Tukey ou Bonferroni, de acordo com as características dos dados analisados. Os dados foram plotados como média \pm EPM na maioria dos experimentos, somente sendo plotados como média \pm DP na validação do método cromatográfico.

Para comparações simples entre os grupos foi utilizado para a análise o teste *t* de Student, não pareado. Uma probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$) foi considerada capaz de revelar diferenças estatisticamente significativas para as análises.

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados conforme descrito no item 3.2.3.5.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA E MACRÓFAGOS INFECTADOS

Nanopartículas (NPs) poliméricas de PLGA foram produzidas encapsulando JVA. Resultados prévios demonstraram que NPs contendo JVA aumentaram a morte bacteriana de *Mtb* quando macrófagos infectados por esta bactéria foram tratados com essa formulação (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012). Para investigar se esses carreadores eram capazes de interagir com células infectadas, foram realizados estudos utilizando a citometria de fluxo e a microscopia confocal.

Para a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo (Fig 8A), levou-se em consideração a granulosidade (SSC) das células e os eventos positivos para FL-2, considerando para o estudo da interação somente as células infectadas por BCG-RFP. A análise por histograma revela um deslocamento de FL-1 nas amostras tratadas com NPs-FITC, o que sugere a associação das NPs-FITC com os bacilos dentro das células infectadas. Estes resultados foram confirmados através de microscopia confocal (Fig. 8B) onde podemos observar que quando macrófagos infectados com BCG-RFP são expostos a NPs-FITC ocorre uma co-localização das partículas com a bactéria, indicando a associação entre as NPs e o bacilo no meio intracelular.

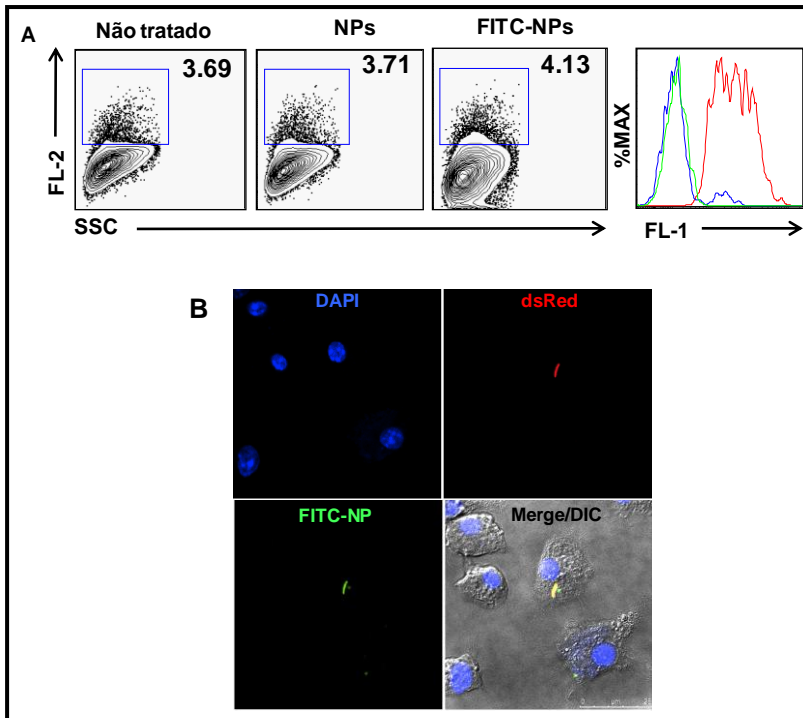


Figura 8: Interação entre NPs poliméricas e macrófagos infectados por *Mycobacterium*. (A) Macrófagos infectados com BCG-RFP expostos a NPs-FITC ou NPs brancas por 1h. Histograma apresentado no painel direito demonstrou a associação entre NPs-FITC (FL-1) e o bacilo dentro do macrófago. Linha verde: macrófagos não tratados; Linha azul: macrófagos expostos a NPs branca; Linha vermelha: macrófagos expostos a NPs-FITC. (B) Imagens de microscopia confocal observando-se os núcleos das células marcados com DAPI, BCG-RFP, NPs-FITC, e a co-localização das imagens confirmando a associação das NPs com o bacilo no meio intracelular.

4.2 ANÁLISE DA INTERAÇÃO *IN VITRO* ENTRE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E *MYCOBACTERIUM*

Para observar de forma mais evidente se ocorre uma interação entre NPs poliméricas e a parede do bacilo, algumas técnicas foram empregadas. Nos resultados obtidos na Fig.9A após análise por citometria de fluxo, observou-se que a expressão de FL-1 nas amostras que foram incubadas com NPs-FITC foi aproximadamente 37 vezes

maior do que nas amostras incubadas com NPs branca, indicando uma associação direta das NPs com o bacilo.

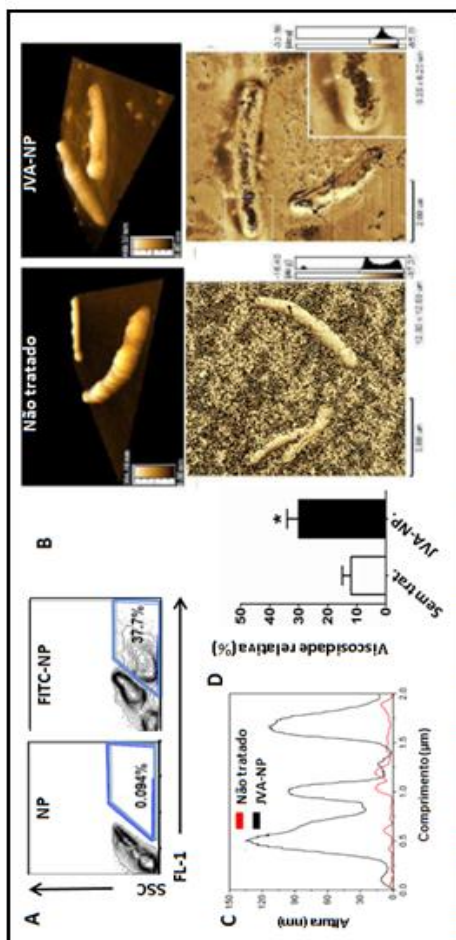


Figura 9: Interação entre NPs poliméricas diretamente com *Mycobacterium*. (A) BCG-RFP expostas a NPs FITC por 4 h, lavadas e analisadas por citometria de fluxo. FL-1 + significa presença de NPs FITC associadas ao bacilo. (B) BCG expostas ou não a NPs JVA por 1h e analisadas por microscopia de força atômica (AFM). (C) Perfil de linha e (D) Medidas de viscosidade relativa na superfície do bacilo obtido a partir de (B) demonstram um perfil compatível com a presença das NPs na superfície dos bacilos expostos as NPs JVA. Resultados representam média \pm E.P.M das medidas obtidas em dois experimentos distintos *, indica uma diferença significativa ($p < 0,05$, Teste *t Student*) nas medidas obtidas entre os grupos expostos ou não as NPs JVA ($n = 3$).

Imagens obtidas por AFM (Fig. 9B) após incubação de BCG com NPs-JVA confirmaram a associação das partículas com a superfície do bacilo como pode ser observado no painel direito superior. Detalhes obtidos em contraste de fase (painel direito inferior) permitem observar a presença das NPs sobre o bacilo. Medidas de perfil de linha e viscosidade relativa, obtidas através das imagens de AFM confirmaram

a presença das NPs sobre a superfície do bacilo. As medidas de perfil de linha (Fig 9C) na superfície do bacilo mostraram um aumento na altura sobre a superfície bacteriana nos bacilos expostos as NPs-JVA, condizente com a presença das NPs. Além disso, as medidas de viscosidade relativa (%) (Fig. 9D) também realizadas na superfície bacteriana demonstraram um aumento significativo de viscosidade ($p < 0,05$) nas amostras expostas às NPs, o que indica a presença de material com diferente viscosidade na parede bacteriana quando comparada as amostras não expostas as NPs. Todos estes resultados obtidos nas análises por AFM sugerem uma significativa associação entre a parede do bacilo e as NPs de JVA.

Para avaliar esta hipótese, uma suspensão bacteriana *M. bovis* BCG foram expostas a NPs JVA, JVA livre, ou não tratadas e após o preparo das amostras analisado por MALDI/TOF- MS para busca do íon JVA na parede bacteriana.

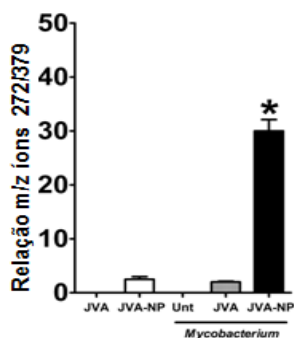


Figura 10: Análise da presença do íon de JVA (m/z 272) por MALDI-TOF/MS na superfície das bactérias incubadas com NPs JVA e JVA livre. Resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas realizadas em sextuplicatas. *, representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos NPs JVA vs não tratado (Unt) ou vs JVA ($p < 0.05$, ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de Tukey).

Observa-se que no grupo em que NPs JVA foram incubadas com BCG, uma maior quantidade do íon JVA foi detectado e associado aos bacilos retidos na membrana em comparação aos grupos tratados com JVA livre ou controles, nos quais somente JVA livre ou NPs de JVA foram aplicadas no sistema filtrante (Fig. 10).

4.3 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA LIVRE ADMINISTRADO PELAS VIAS INTRAPERITONEAL E ORAL

Os resultados obtidos por De Faria, Roman, Souza, De Vecchi *et al.*, (2012) demonstraram que o JVA apresentou atividade antimicobacteriana tanto contra *Mtb* (cepa H37Rv) em cultura quanto em *Mtb* presentes no interior de macrófagos infectados com este mesmo patógeno, tendo uma maior atividade quando encapsulado em sistemas de liberação nanoestruturados.

Dando continuidade aos estudos com esta molécula, realizamos uma avaliação do perfil farmacocinético do JVA após administração em camundongos, utilizando para a quantificação do composto no plasma destes animais uma metodologia por cromatografia líquida, que foi desenvolvida e previamente validada.

4.3.1 Validação de método cromatográfico para dosagem de JVA em plasma de camundongos

A validação do método cromatográfico envolveu ensaios de repetibilidade (intraensaio) e reprodutibilidade (interensaio), levando em consideração a análise dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limites de detecção e quantificação e estabilidade.

Na figura 11, observam-se cromatogramas obtidos das análises de amostras que foram extraídas de plasma de animais não tratados (branco) (Fig. 11A) e de plasma contaminado com padrão de JVA (Fig. 11B). A sobreposição de ambos os cromatogramas indicou a seletividade do método, observando-se que não há a presença de interferentes no tempo de retenção do JVA (8,9 min).

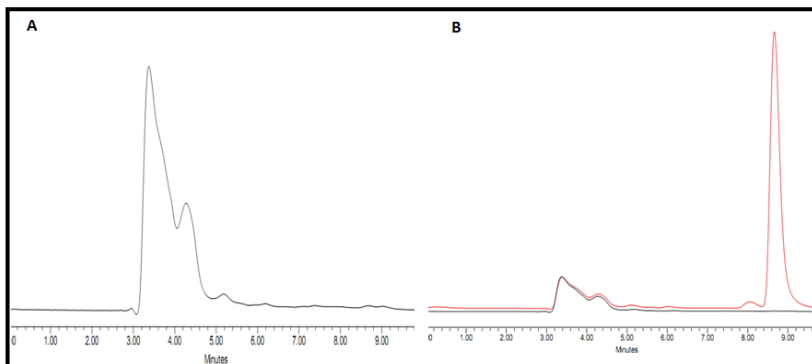


Figura 11: Exemplos de cromatogramas obtidos por CLAE para análise de JVA em plasma de camundongos conforme metodologia descrita nos M&M. (A): Amostra de plasma branco, onde é mostrada a ausência de picos nos tempos de retenção do composto de interesse; (B): Amostra de plasma contaminada com JVA (1.000 ng/ml).

As curvas de calibração foram construídas contaminando-se plasma branco com concentrações de JVA entre 100 e 10.000 ng/mL. Na Figura 12, estão ilustradas as curvas obtidas nos dias dos ensaios de validação, confirmando-se a linearidade do método expresso pelo coeficiente de correlação linear $R^2 > 0,998$.

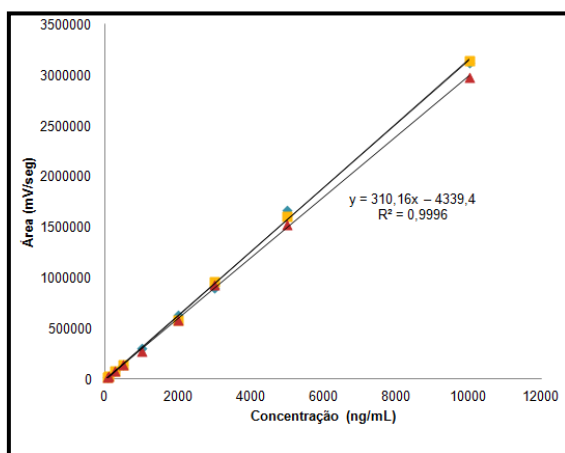


Figura 12: Curvas de calibração construídas após análise por CLAE de amostras extraídas de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de JVA. Linearidade foi obtida com concentrações entre 100 e 10.000 ng/mL ($R^2 > 0,998$).

A variabilidade do método, avaliada através do cálculo da precisão e exatidão no intraensaio e interensaio, juntamente com os valores de recuperação do intraensaio estão listados na tabela 2.

A variação do intraensaio, determinada pela análise de cinco amostras de plasma de cada uma das concentrações de 100, 1.000 e 5.000 ng/mL de JVA, dentro de uma mesma corrida, originou valores de precisão, expressos pelo C. V. (%) de 6,0, 2,0 e 3,0, respectivamente. A Tabela 2 mostra também o cálculo da exatidão do intraensaio, expressa em porcentagem (%). Considerando-se a inclusão de todas as alíquotas das três concentrações as médias das exatidões foram de $114,6 \pm 6,8$ % (100 ng/mL), $102,7 \pm 2,0$ % (1.000 ng/mL) e $103,8 \pm 3,2$ (5.000 ng/mL) (média \pm DP). A média de recuperação (%) do método após a extração e quantificação das amostras foi de $90,3 \pm 6,4$ % (média \pm DP).

A reprodutibilidade do método foi avaliada através dos ensaios de precisão e exatidão do interensaio, mostrados na tabela 2, obtendo-se valores de C.V. (%) para as concentrações de 100, 1.000 e 5.000 ng/mL de 7,3, 4,6 e 3,1, respectivamente. As exatidões (%) calculadas para as mesmas concentrações foram de $118,7 \pm 8,7$ %, $104,8 \pm 4,8$ e $104,1 \pm 3,2$ (média \pm DP).

A sensibilidade do método dada pelo limite de detecção, calculado como sendo três vezes o ruído da linha de base, foi de 35,1 ng/mL, enquanto que o limite de quantificação calculado como sendo dez vezes o ruído da linha de base foi de 106,5 ng/mL.

Tabela 2: Variabilidade e reprodutibilidade do método cromatográfico avaliadas pelos cálculos do coeficiente de variação do intraensaio e interensaio para o JVA e recuperação obtidos em plasma de camundongo após extração das amostras e análise por CLAE.

INTRAENSAIO			
Concentração adicionada (ng/mL)	Precisão (n=5)	Exatidão (%) (n=5)	Recuperação (%) (n=5)
	Conc. obtida (ng/mL) Média ± DP C.V.(%)	Média ± DP	Média ± DP C.V. (%)
100	114,5 ± 6,8 (6,0)	114,6 ± 6,8	96,0 ± 6,5 (6,9)
1000	1026,5 ± 20,5 (2,0)	102,7 ± 2,0	84,7 ± 1,7 (2,0)
5000	5190,2 ± 158,0 (3,0)	103,8 ± 3,2	85,2 ± 2,6 (3,1)
INTERENSAIO			
Concentração adicionada (ng/mL)	Precisão (n=9)	Exatidão (%) (n=9)	
	Conc. Obtida (ng/mL) Média ± DP C.V.(%)	Média ± DP	
100	118,7 ± 8,7 (7,3)	118,7 ± 8,7	
1000	1047,9 ± 48,0 (4,6)	104,8 ± 4,8	
5000	5205,3 ± 161,0 (3,1)	104,1 ± 3,2	

DP: Desvio Padrão; **n:** número de amostras; **C.V.:** Coeficiente de Variação; **C. V. (%) = DP / Média x 100.**

A estabilidade, tanto dos padrões analíticos como das amostras de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de JVA foi testada frente à luz UV, congelamento/descongelamento e temperatura. Como pode ser observado na figura 13, os padrões analíticos foram estáveis em todas as condições testadas, porém nas amostras de plasma contaminado, observou-se uma redução na recuperação do analito estatisticamente significativa, indicando uma degradação das amostras quando expostas ao congelamento/descongelamento e ao calor (45°C).

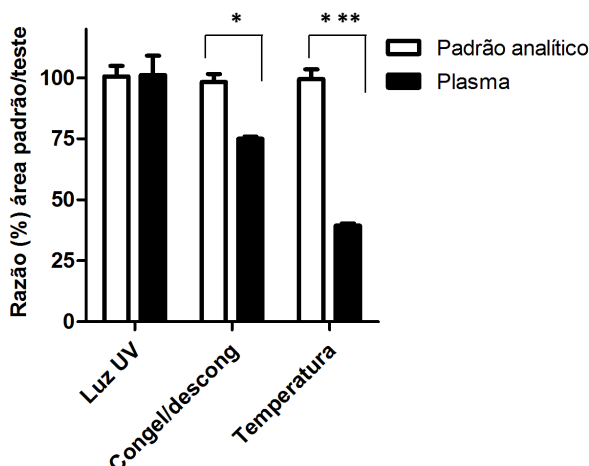


Figura 13: Estabilidade do JVA em solução e em amostras de plasma contaminadas com o analito. Amostras de JVA em solução e plasma foram submetidas a diferentes condições e analisadas quanto a sua estabilidade. Os resultados representam a média \pm DP ($n=3$). *, indica diferença significativa entre o padrão e plasma ($p < 0,05$) e ***, indica diferença significativa entre padrão e plasma com $p < 0,001$ expostas às mesmas condições (ANOVA duas vias, seguidas de *post hoc* Bonferroni).

4.3.2 Análise farmacocinética de JVA livre administrado pelas vias intraperitoneal e oral

A partir da validação do método cromatográfico, este foi utilizado para quantificar JVA em plasma após a administração deste composto livre pelas vias intraperitoneal e oral para posterior avaliação do perfil farmacocinético desta molécula em camundongos.

Na figura 14 observam-se as curvas de concentração plasmática em função do tempo, obtidas após a administração de JVA livre. Nesta figura, os perfis das curvas de concentração *vs.* tempo apresentaram padrões semelhantes, para as 2 vias de administração escolhidas, porém, a análise dos parâmetros farmacocinéticos derivados destas curvas e apresentados na tabela 3 mostrou uma redução na biodisponibilidade do JVA quando administrado por via oral em comparação a administração por via IP. Neste aspecto, nota-se uma redução significativa na C_{max} e na AUC do JVA empregado por via oral ($p < 0,05$, teste *t* Student).

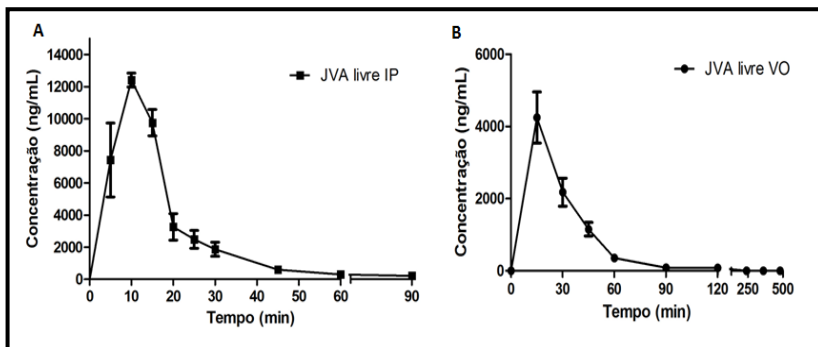


Figura 14: Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de JVA livre pelas vias IP (A) e VO (B) na dose de 50 mg/Kg em camundongos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada ponto (n= 5- 6 animais por tempo de coleta). (IP: intraperitoneal; VO: via oral).

A partir deste perfil, calcularam-se os parâmetros farmacocinéticos pelo modelo monocompartimental, o qual foi o que melhor se adaptou aos dados obtidos, os quais estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de JVA livre obtidos em camundongos após a administração pelas vias intraperitoneal e oral na dose de 50 mg/Kg.

Parâmetros	JVA livre IP	JVA livre VO
C_{max} (ng/ml)	12.408 ± 161	4.249 ± 315*
T_{max} (min)	10	15
AUC_[0-inf] (ng/ min mL)	219.303 ± 6825	138.083 ± 4635*
t_{1/2 abs} (min)	1,7	3,7
t_{1/2 el} (min)	13,35	14,7
k_{el} (min ⁻¹)	0,052	0,047
Depuração (mL/min)	4,8	4,9
Vd (mL)	92,3	104,2

C_{max}: Concentração plasmática máxima; **T_{max}:** Tempo em que é atingido C_{max}; **AUC:** Área sob a curva de zero ao infinito; **t_{1/2 abs}:**Tempo de meia-vida de absorção; **t_{1/2 el}:** Tempo de meia-vida de eliminação; **k_{el}:** Constante de eliminação; **Vd:** Volume de distribuição. Resultados expressos como média ± EPM (n= 5-6 animais por tempo). *, indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados entre os grupos JVA IP e JVA VO. (Teste *t* Student).

A tabela 3 apresenta os dados dos principais parâmetros farmacocinéticos do JVA obtidos nas condições acima. Nesta tabela podemos observar que ocorreu uma redução significativa nos parâmetros de C_{max} (4.249 ng/mL) e AUC_[0-inf], (138.083 ng/min.mL) do grupo tratado pela VO em comparação a administração pela via IP (C_{max} 12.408 ng/mL e AUC_[0-inf] 219.303 ng/min.mL). Com estes resultados, pode-se observar uma redução na biodisponibilidade “oral” relativa de cerca de 40%, obtido através do cálculo da razão entre a AUC da via oral e da via IP ($F_R = 0,63$).

Além disso, foram observadas diferenças nos parâmetros de T_{max} (15 vs 10min) e meia-vida de absorção (3,7 vs 1,7 min) obtidos após administração pela VO em relação a via IP. Os demais parâmetros como a constante de eliminação, meia-vida de eliminação, depuração e volume de distribuição não apresentaram diferenças entre os dois grupos mencionados.

4.4 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA

Na figura 15 observa-se o perfil de concentração plasmática em função do tempo obtido após a administração das NPs de JVA pela via IP. Pode-se observar que não se obteve um aumento na permanência do composto no plasma com o uso desses sistemas nanoestruturados por esta via de administração, uma vez que em aproximadamente 120 min o JVA foi praticamente removido da circulação.

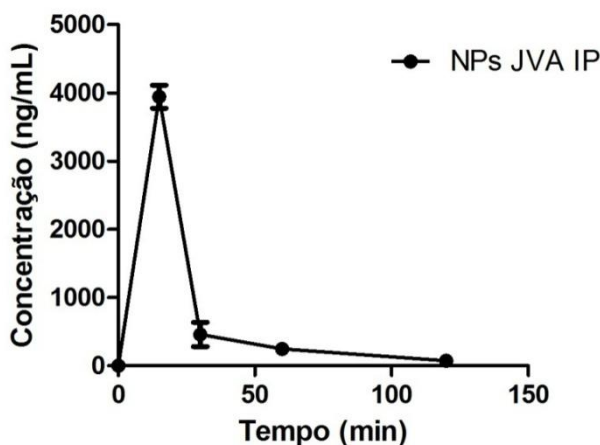


Figura 15: Curva de concentração plasmática em função do tempo obtida após administração de NPs JVA pela via IP na dose de 50 mg/Kg em camundongos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada ponto (n= 4 animais por tempo de coleta).

Dessa forma, como não foi observada uma biodisponibilidade adequada e/ou um aumento no tempo de permanência do JVA na circulação após a administração das NPs, micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA foram posteriormente produzidas e avaliadas

quanto ao perfil farmacocinético após a sua administração em camundongos. MPs poliméricas de PLGA contendo JVA foram utilizadas para a obtenção da melhora do perfil farmacocinético do JVA, uma vez que os estudos preliminares com o uso das NPs não foram promissores.

4.5 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE JVA ENCAPSULADO EM MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA

Para a realização dos ensaios farmacocinéticos utilizando micropartículas (MPs) de JVA, estas foram preparadas e foi necessária a sua caracterização quanto ao seu tamanho, morfologia e teor de JVA incorporado às partículas. Também, realizou-se um estudo de liberação *in vitro* destas partículas em três meios de liberação distintos para se possível relacionar com os resultados observados *in vivo*.

Após estes estudos de caracterização, as MPs de JVA foram utilizadas nos ensaios para avaliar a atividade antimicobacteriana do JVA encapsulado neste tipo de carreador em cepa padrão de *Mtb* (H37Rv). Em seguida, realizou-se a administração destas partículas em camundongos pelas vias intraperitoneal e oral para a análise farmacocinética do JVA encapsulado em MPs, como descrito no item 3.2.3.

Dessa forma, primeiramente serão apresentados os resultados da caracterização das MPs, a atividade antimicobacteriana *in vitro* e por fim o perfil farmacocinético obtido após administração das MPs de JVA pelas vias intraperitoneal e oral.

4.5.1 Caracterização das micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA

A caracterização das MPs foi realizada através da avaliação de alguns parâmetros, dentre eles a eficiência de encapsulação e o teor de fármaco. Além disso, a avaliação morfológica e de tamanho de partícula das formulações nos permitiu analisar os aspectos superficiais das partículas e seu tamanho.

A figura 16 apresenta uma curva de calibração utilizada para o cálculo do teor de JVA nas MPs de PLGA realizada por CLAE conforme descrito previamente.

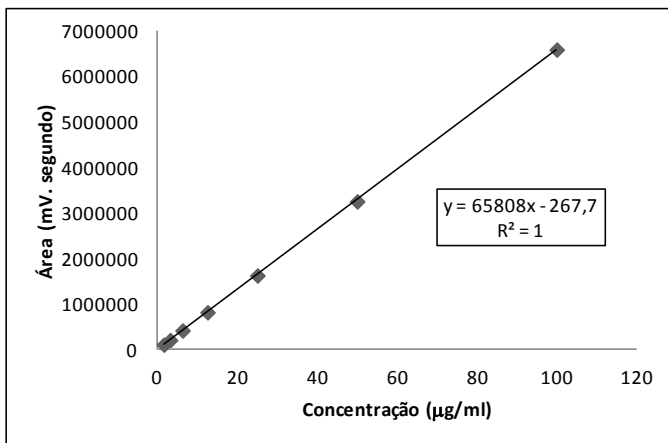


Figura 16: Curva de calibração obtida através da análise por CLAE dos padrões de JVA, onde R^2 representa o coeficiente de regressão linear.

Na figura 17 apresentamos exemplos de cromatogramas extraídos a partir da análise do padrão de JVA na concentração de 3,125 µg/mL, além da sobreposição dos cromatogramas das análises do precipitado das MPs brancas e MPs JVA, demonstrando a seletividade do método para esta análise e da suspensão total comparado ao padrão de JVA, dosados por CLAE. O tempo de retenção de JVA nas condições empregadas foi de 4,7 minutos.

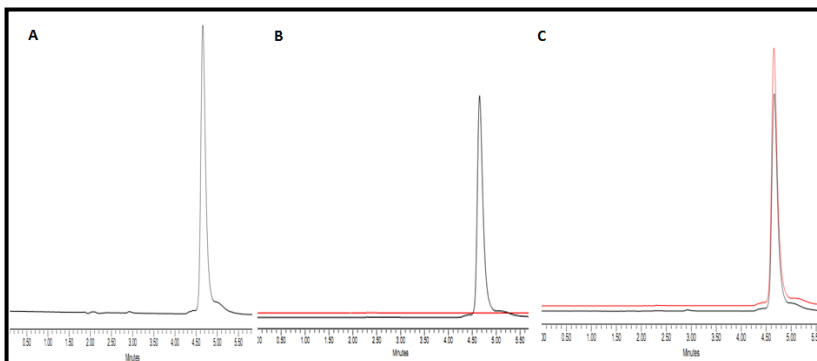


Figura 17: Exemplos de cromatogramas obtidos por CLAE. A) Padrão de JVA na concentração de 3,125 µg/mL. B) Precipitado de MPs branca (linha vermelha) e MPs JVA (linha preta). C) Sobreposição das análises da Suspensão Total (linha vermelha) com padrão JVA 25 µg/mL (linha preta).

Com o objetivo de otimizar a quantidade de JVA que poderia ser incorporado às MPs, formulações com concentrações crescentes deste composto foram preparadas e avaliadas quanto a eficiência de encapsulação, teor de fármaco e recuperação. Os valores encontrados para eficiência de encapsulação (EE %), teor de fármaco e taxa de recuperação encontram-se ilustrados na figura 18. Formulações com 20, 40, 50 e 80 mg de JVA, chamadas MP20, MP40, MP50 e MP80, (relação fármaco:polímero 1:5; 1:2,5; 1:2 e 1:1,25) apresentaram uma eficiência de encapsulação média de 59,5, 78,5, 89,1 e 84%, respectivamente, com um teor de fármaco de 1191,8, 3144,9, 4457,9 e 6725,1 µg/ml. A taxa de recuperação (Fig. 18C) ficou acima de 86% para todas as formulações, com a maioria dos resultados próximos a 100% demonstrando haver pouca perda de fármaco durante a produção das MPs.

A análise dos resultados nos permitiu observar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a EE% da formulação de 20mg em relação às demais, (Fig. 18A), porém observou-se que o teor de fármaco aumentou proporcionalmente à quantidade de fármaco adicionada para todas as formulações (Fig. 18B). Esta situação pode estar relacionada à saturação do carreador, uma vez que o aumento do teor não foi acompanhado pelo aumento da EE %. Apesar de não haver diferença significativa entre a EE% encontrada entre as formulações MP40 e MP50, observou-se que ocorre uma tendência de aumento de EE% na formulação MP50 (de 78,5 para 89,1 %) em relação a MP40, o que não foi observado em relação a MP 80, que apresentou um valor de EE de 84%, inferior ao que foi encontrado para MP50 (89,1%). Além disso, o aspecto macroscópico das formulações (dados não mostrados) indicava a presença de quantidade significativa de fármaco e polímero precipitado na formulação MP80. Desta forma, escolheu-se a formulação MP50 (relação fármaco: polímero 1:2) como formulação padrão para dar sequência aos demais experimentos.

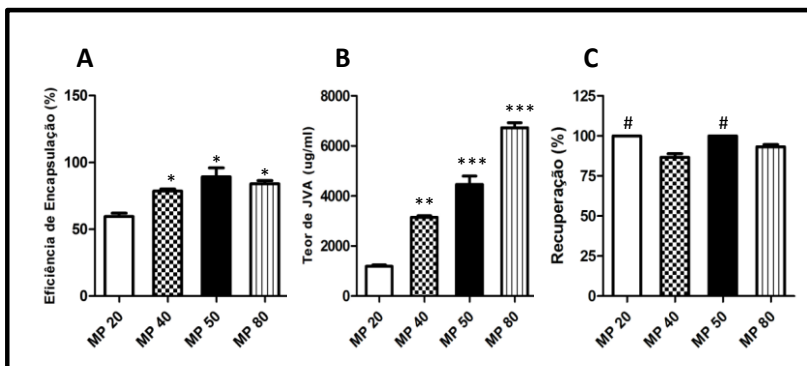


Figura 18: (A) Eficiência de Encapsulação (%), (B) Teor de fármaco (µg/ml), (C) Taxa de recuperação de MPs de PLGA preparadas com diferentes concentrações de JVA. (A) * representa diferença estatística entre MP 20 e demais formulações ($p < 0,05$); (B) ** representa diferença estatística entre MP 20 e MP 40 ($p < 0,01$) e *** representa diferença estatística de MP 50 e MP 80 em relação a MP 20 ($p < 0,001$); (C) # representa a diferença estatística de MP 20 e MP 50 e as demais ($p < 0,05$). Não houve diferença em relação à taxa de recuperação entre MP 20 e MP 50. Todos os resultados foram expressos como média \pm EPM. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey ($n=2$)

A figura 19 ilustra a porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%) e o teor de fármaco obtido após a análise de diversas formulações em diferentes dias. No dia 1, a EE% variou de 73,8 a 79% com teor de JVA entre 3.692 e 3.948 µg/ml. No dia 2, esses valores variaram entre 75,8 e 84,4% para EE% e entre 3.791 e 4.219 µg/ml para o teor de JVA. Não houve diferença estatística entre os diferentes dias de preparação em relação à eficiência de encapsulação e o teor de fármaco.

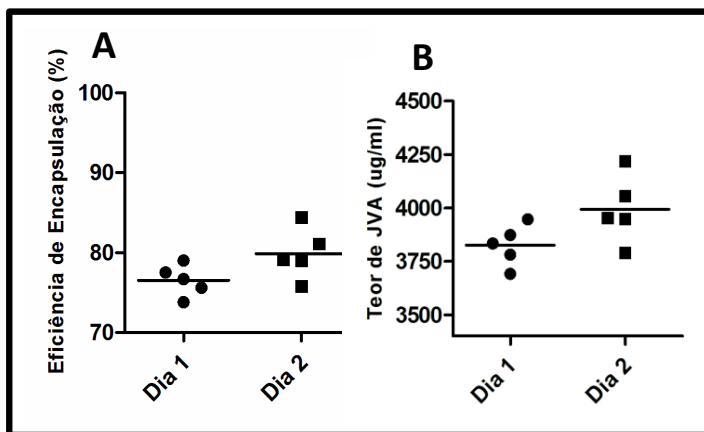


Figura 19: (A) Eficiência de Encapsulação e (B) Teor de JVA em MP50. Resultados apresentados como média \pm EPM. Análise estatística empregando-se o teste *t Student*.

A determinação da distribuição granulométrica das MPs brancas e de JVA foram avaliados pela técnica de difração a laser. Os resultados obtidos após a análise são mostrados na tabela 4 e ilustrados na figura 20 onde estão representadas as curvas de distribuição granulométrica obtidas para MPs brancas (A) e de JVA (B).

Tabela 4: Distribuição granulométrica de MPs brancas e de JVA.

Formulação	d (0,1)	d(0,5)	d(0,9)	D[3,2] superfície
MPs branca	1,36 \pm 0,02	2,03 \pm 0,03	2,95 \pm 0,05	1,93 \pm 0,03
MPs JVA	1,24 \pm 0,17	2,04 \pm 0,02	3,11 \pm 0,10	1,85 \pm 0,15

Resultados foram expressos como média \pm DP. A análise estatística foi realizada somente para o valor médio da medida do tamanho da superfície D [3,2], n = 3 (Teste *t Student*).

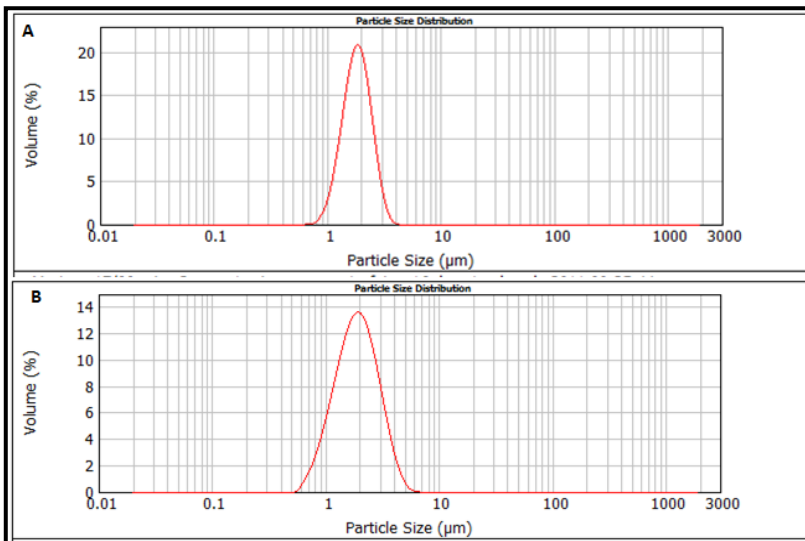


Figura 20: Gráficos da distribuição granulométrica de MPs brancas (A) e de MPs de JVA (B). O eixo y representa o volume em porcentagem de amostra adicionada para a análise e o eixo x apresenta o tamanho em μm das partículas.

O tamanho médio das partículas (D [3,2]) tanto das MPs brancas ($1,93 \pm 0,03 \mu\text{m}$) como daquelas com JVA ($1,85 \pm 0,15 \mu\text{m}$) não foram diferentes estatisticamente, demonstrando que a incorporação do JVA nas MPs não alterou o tamanho de partícula. Os demais dados mostrados na tabela 4 e na figura 20 evidenciam a distribuição granulométrica obtida após as medidas. Para exemplificar, os valores mostrados na tabela 4 indicam que, em relação as MPs brancas, menos de 10% das amostras tinham um tamanho inferior a $1,36 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (média \pm DP), em torno de 50% apresentam um tamanho médio de $2,03 \pm 0,03 \mu\text{m}$ e que mais de 90% das partículas encontra-se com um tamanho inferior a $2,95 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Desta forma, pode-se dizer que a distribuição granulométrica obtida para medidas realizadas a partir das MPs brancas variou de 1,36 a $2,95 \mu\text{m}$, enquanto que para as MPs de JVA estes valores foram de 1,24 a $3,11 \mu\text{m}$, podendo-se inferir de um modo geral que o tamanho médio das partículas encontra-se na sua maioria entre 1,2 e $3,1 \mu\text{m}$.

A análise morfológica das MPs foi obtida através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na figura 21 estão representadas as fotomicrografias obtidas pela análise das amostras de MPs brancas (A e B) e de MPs JVA (C e D). Através das fotomicrografias foi possível

observar que as MPs poliméricas obtidas através da técnica da emulsificação simples com evaporação do solvente apresentam formato esférico, superfície lisa e dimensões micrométricas.

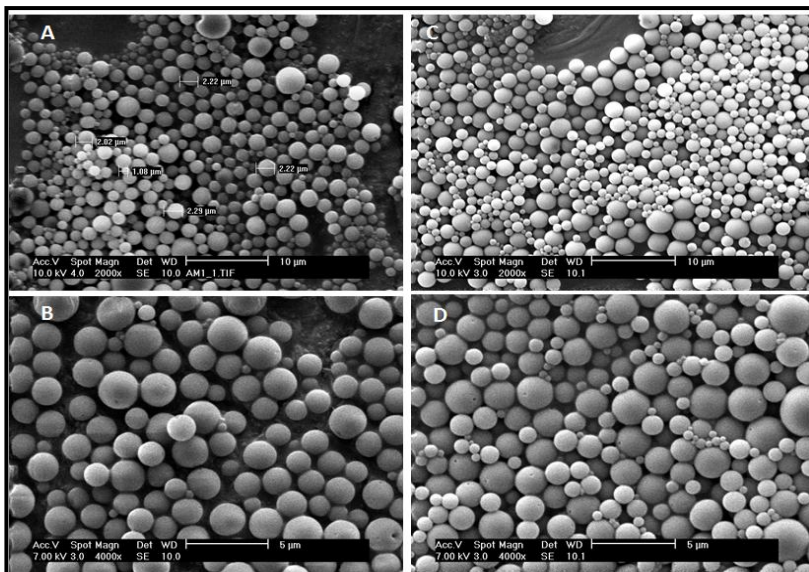


Figura 21: Fotomicrografias de MPs poliméricas brancas e com JVA obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A e B): MPs brancas em aumentos de 2.000 e 4.000 vezes; (C e D): MPs JVA nos mesmos aumentos.

Ensaio de liberação *in vitro* foram realizados em três meios de liberação distintos com o intuito de avaliar a liberação de JVA das MPs nos meios: Fluido gástrico simulado pH 1,2 (FGS), fluido intestinal simulado pH 6,8 (FIS) e em tampão fosfato pH 7,4. A figura 22 apresenta os perfis de liberação para o JVA a partir de MPs poliméricas de PLGA. Os perfis de liberação obtidos nos três meios de liberação analisados mostraram-se distintos, como pode ser observado na figura 22.

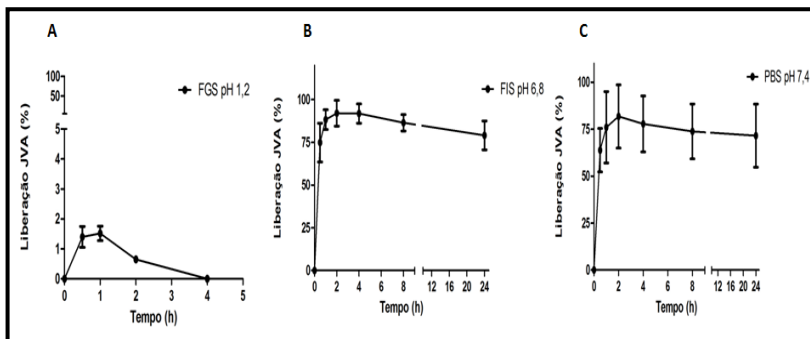


Figura 22: Perfil de liberação de JVA a partir de MPs poliméricas de PLGA em diferentes meios de liberação. (A) Fluido gástrico simulado (FGS); (B) Fluido intestinal simulado pH 6,8 (FIS); (C) Tampão fosfato pH 7,4 (PBS).

Observa-se que no FGS praticamente não ocorreu liberação de JVA a partir das partículas. O tempo do estudo de liberação até 4hs neste caso foi estabelecido, pois ocorre degradação do JVA neste meio, sendo que somente é possível quantificar esta molécula até 4hs após o composto ser colocado em contato com este meio de dissolução (Apêndice A). Já no caso do FIS, observa-se uma liberação em torno de 75% em meia-hora, chegando a aproximadamente 80% na primeira hora e esta se mantém até 24hs. Em PBS, a liberação de JVA ocorre de maneira semelhante ao FIS, ocorrendo uma liberação inicial rápida em torno de 60% em meia hora e em 2hs esta liberação chega a 80%, a qual se mantém constante até 24hs.

4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobacteriana de micropartículas de JVA em culturas de *Mtb* H37Rv.

Resultados prévios demonstraram que nanopartículas poliméricas de JVA apresentaram atividade antimicrobacteriana *in vitro* contra cepa H37Rv de *Mtb* (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012). Para verificar esta atividade com MPs, realizaram-se os ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT, com confirmação da morte bacteriana após contagem de UFC em meio sólido 7H10.

Na figura 23 estão ilustrados os resultados de viabilidade celular (A) e contagem de UFC (B) obtidos após o tratamento de culturas de *Mtb* com diferentes concentrações de JVA livre e encapsulado em MPs. Observou-se que tanto JVA livre como as MPs de JVA apresentam

atividade antimicobacteriana frente à cepa de H37Rv dependente da dose.

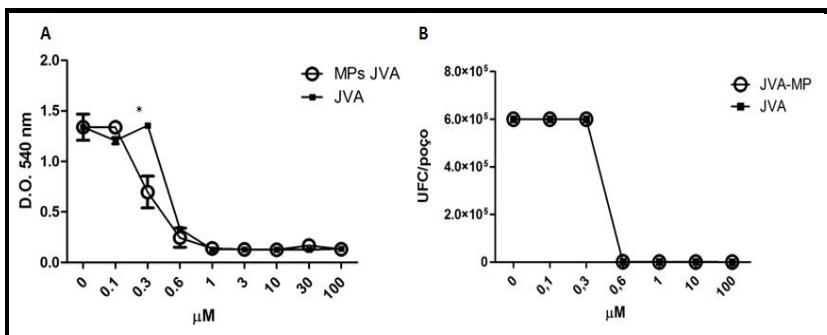


Figura 23: Avaliação da viabilidade celular por MTT e morte celular de cepa H37Rv após o tratamento por 7 dias das culturas com JVA livre e MPs de JVA. (A) Viabilidade celular avaliada pelo método do MTT; (B) Contagem de UFC em placa de Petry em meio sólido 7H10 após 28 dias de incubação. Resultados apresentados como média \pm EPM das leituras em triplicata. *, indica diferença significativa ($p < 0,001$) na viabilidade celular avaliada pelo método do MTT entre JVA livre e MPs de JVA na dose de 0,3 μM (ANOVA duas vias, seguida de *post hoc* Bonferroni).

Detalhes observados na figura 23 demonstram que os tratamentos das culturas bacterianas com diferentes concentrações de JVA livre e encapsulado apresentaram um perfil de atividade inibitória similar. Apesar de observarmos uma redução significativa na viabilidade celular com as MPs na concentração de 0,3 μM pelo método do MTT, não houve redução na contagem de UFC nesta mesma concentração. Contudo, observa-se um efeito inibitório tanto do JVA livre como encapsulado em MPs em concentrações a partir de 0,6 μM, resultado este reforçado pela redução na contagem de UFC. Desta forma, a presença das MPs não comprometeu a atividade antimicobacteriana observada para o JVA livre.

4.5.3 Análise farmacocinética de JVA encapsulado em micropartículas poliméricas de PLGA

Micropartículas de PLGA contendo JVA foram administradas pelas vias oral e intraperitoneal para posterior análise do perfil farmacocinético obtido com o uso desses carreadores. Na figura 24 estão delineadas as curvas das médias das concentrações plasmáticas em

função do tempo obtidas após a administração de MPs JVA pela via IP e oral. A partir destas curvas, calcularam-se os parâmetros farmacocinéticos os quais estão listados na tabela 5.

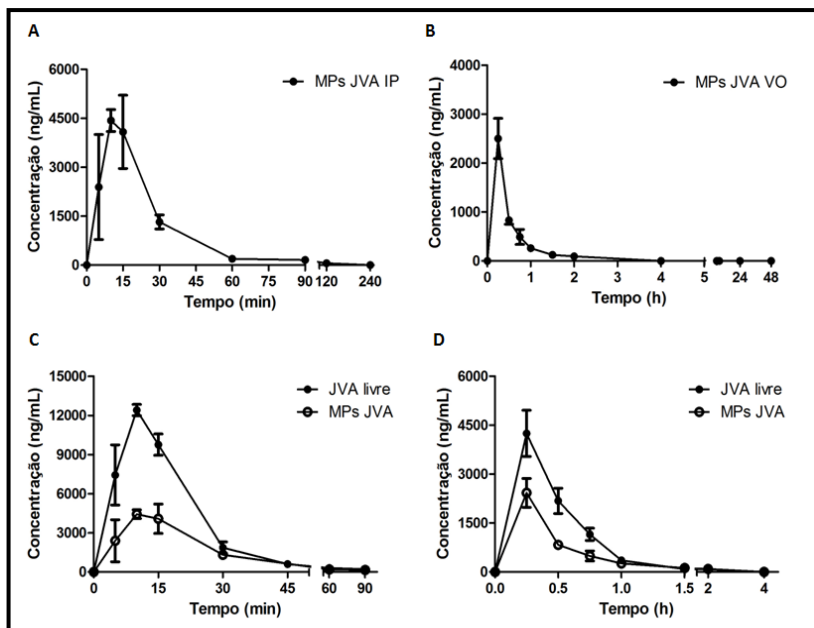


Figura 24: Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de JVA livre e em MPs pelas vias IP (A e C) e oral (B e D) na dose de 50 mg/Kg em camundongos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada ponto (n= 4-5 animais por tempo de coleta). (**MPs JVA IP:** micropartículas via intraperitoneal; **MPs JVA VO:** micropartículas via oral).

Comparando-se os parâmetros farmacocinéticos (Tab. 5) obtidos a partir da administração de JVA livre e MPs de JVA pela via IP na dose de 50 mg/Kg em camundongos, observa-se uma redução de C_{max} de cerca de três vezes (12.408 ng/mL vs 4.430 ng/mL), respectivamente, porém sem alterações em T_{max} . Os valores de $AUC_{[0-\infty]}$ do grupo tratado com as MPs (119.033 ng/mL.min) também foram reduzidos em comparação com o grupo que recebeu JVA livre (219.30 ng/mL.min), resultando em uma “biodisponibilidade relativa” de 0,54, calculada pela razão entre as AUCs dos grupos tratados com MPs de JVA e JVA livre (considerando-se uma biodisponibilidade do JVA livre por via IP de 100%). Ocorreu um aumento na meia-vida de

absorção (1,7 vs 3,4 min), porém não houve diferença na meia-vida de eliminação (13,35 vs 17,2 min), na depuração (4,8 vs 4,6 mL/min), no volume de distribuição (92,3 vs 114,2 mL) e na k_{el} , comparando-se JVA livre vs MPs JVA pela via IP.

Tabela 5. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de JVA livre e encapsulado em MPs obtidos em camundongos após a administração pelas vias intraperitoneal e oral na dose de 50 mg/Kg.

Parâmetros	JVA livre IP	JVA MPs IP	JVA livre VO	JVA MPs VO
C_{max} (ng/ml)	12.408 ± 161	4.430 ± 193*	4.249, ± 316	2.427 ± 198*
T_{max} (min)	10	10	15	15
AUC_[0-inf] (ng/ min mL)	219.303 ± 6826	119.033 ± 5370*	138.083 ± 4636	72.989 ± 2120*
t_{1/2 abs} (min)	1,7	3,4	3,7	3,3
t_{1/2 el} (min)	13,35	17,2	14,7	16,4
k_{el} (min ⁻¹)	0,052	0,04	0,047	0,042
Depuração (mL/min)	4,8	4,6	4,9	4,7
Vd (mL)	92,3	114,2	104,2	111,9

C_{max}: Concentração plasmática máxima; **T_{max}:** Tempo em que é atingido C_{max}; **AUC:** Área sob a curva de zero ao infinito; **t_{1/2 abs}:**Tempo de meia-vida de absorção; **t_{1/2 el}:** Tempo de meia-vida de eliminação; **kel:** Constante de eliminação; **Vd:** Volume de distribuição. Resultados expressos como média ± EPM (n= 5-6 animais por tempo). *, indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados entre os grupos JVA livre vs MPs IP e JVA livre vs MPs VO. (Teste *t* Student).

A administração das MPs de JVA pela VO na mesma dose de JVA livre apresentou resultados na mesma direção da via IP,

observando-se redução de C_{max} , porém menos acentuada do que observada pela via IP (2.427 vs 4.249 ng/mL), respectivamente. Os valores de $AUC_{[0-\infty]}$ do grupo tratado com as MPs (72.989 ng/min.mL) também foram reduzidos em comparação com o grupo que recebeu JVA livre (138.083 ng/min.mL), ambos pela via oral. Assim a biodisponibilidade de MPs de JVA em relação ao JVA livre, ambos por via oral, foi de cerca de 52%. Porém, quando a comparação é feita com o JVA livre dado por via IP, considerado tendo 100% de biodisponibilidade, este valor se reduz para cerca de 34%. A biodisponibilidade foi calculada pela razão entre as AUCs dos grupos tratados com MPs de JVA e JVA livre, multiplicado por 100). Como já visto para a via IP a depuração (4,9 vs 4,7 mL/min), o volume de distribuição (104,2 vs 111,9 mL) e demais parâmetros como a meia-vida de absorção (3,7 vs 3,3 min), a meia-vida de eliminação (14,7 vs 16,4 min) e k_{el} (0,047 vs 0,042 min^{-1}) foram semelhantes para o JVA livre ou encapsulado em MPs.

4.6 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DE ISONIAZIDA EM PLASMA DE CAMUNDONGOS

A nossa observação de que o JVA é rapidamente removido do plasma, mesmo quando administrado na forma de MPs e também pela constatação de que esta molécula sofre degradação em meio ácido, resolvemos investigar se o JVA, administrado livremente ou em MPs, poderia ser convertido *in vivo* no seu precursor, a isoniazida.

4.6.1 Análise cromatográfica por CLAE

Para ser possível a identificação e quantificação de INH, adaptou-se um método cromatográfico utilizado para quantificar INH por CLAE (CALLERI *et al.*, 2002) e um método de extração de INH a partir de amostras de plasma (VERMA *et al.*, 2008). Como a metodologia analítica já estava descrita na literatura realizou-se uma validação parcial deste método cromatográfico para padronização das nossas condições experimentais. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

O tempo de retenção cromatográfica para INH nas condições cromatográficas estabelecidas foi de 3 min (dados não mostrados). As curvas de calibração construídas em plasma branco foram lineares para as concentrações de INH entre 200 e 10.000 ng/mL. A figura 25 ilustra

um exemplo destas curvas de calibração onde se observa uma boa linearidade expressa pelo coeficiente de correlação linear $R^2 > 0,999$.

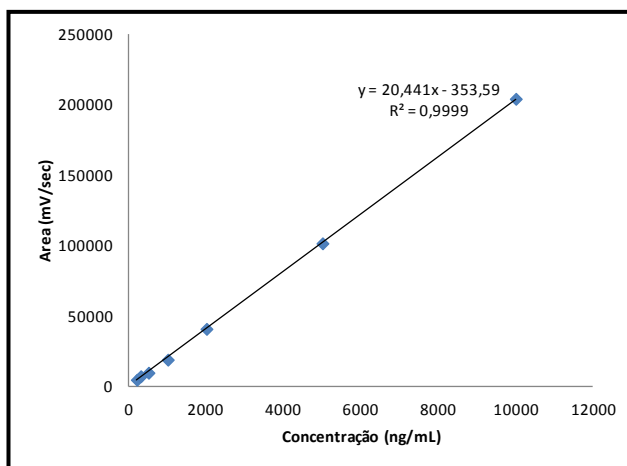


Figura 25: Exemplo de curva de calibração obtida através da análise por CLAE das amostras de plasma contaminadas com concentrações conhecidas de INH, extraídas conforme a metodologia descrita, onde R^2 representa o coeficiente de regressão linear.

A variabilidade do método, avaliada através do cálculo da precisão e exatidão no intraensaio e de precisão no interensaio, juntamente com os valores de recuperação do intraensaio estão listados na tabela 6.

A variação do intraensaio, determinada pela análise de cinco amostras de plasma contendo 200, 1.000 e 5.000 ng/mL de INH, dentro de uma mesma corrida, originou valores de C. V. (%) de 5,3, 1,0 e 6,0, respectivamente. A tabela 6 mostra também o cálculo da exatidão do intraensaio, expressa em porcentagem (%). Considerando-se a inclusão de todas as alíquotas das três concentrações as médias das exatidões foram de $117,9 \pm 6,2$ (200 ng/mL), $100,6 \pm 1,0$ % (1000 ng/mL) e $100,4 \pm 5,6$ (5000 ng/mL) (média \pm DP). A recuperação do método foi acima de 60% para todas as alíquotas.

A reprodutibilidade do método foi avaliada através dos ensaios de precisão do interensaio, mostrados na tabela 6, obtendo-se valores de C.V. (%) para as concentrações de 200, 1.000 e 5.000 ng/mL de 9,6, 6,8 e 4,8, respectivamente.

Tabela 6: Variabilidade e reprodutibilidade do método cromatográfico avaliadas pelos cálculos do coeficiente de variação do intraensaio e interensaio para INH e recuperação obtidos em plasma de camundongo após análise por CLAE.

INTRAENSAIO			
Concentração adicionada (ng/mL)	Precisão (n=5)	Exatidão (%) (n=5)	Recuperação (%) (n=5)
	Conc. Obtida (ng/mL) Média ± DP C.V.(%)	Média ± DP	Média ± DP C.V.(%)
200	235,7 ± 12,5 (5,3)	117,9 ± 6,2	60,5 ± 3,4 (5,7)
1000	1006,0 ± 9,9 (1,0)	100,6 ± 1,0	65,6 ± 0,7 (1,0)
5000	5018,1 ± 298,4 (6,0)	100,4 ± 5,6	66,5 ± 4,0 (6,0)
INTERENSAIO			
Concentração adicionada (ng/mL)	Precisão (n=9)		
	Conc. obtida (ng/mL) Média ± DP C.V.(%)		
200	222,9 ± 21,4 (9,6)		
1000	986,9 ± 67,0 (6,8)		
5000	5162,3 ± 246,7 (4,8)		

DP: Desvio Padrão; **n:** número de amostras; **C.V.:** Coeficiente de Variação;
C. V. (%) = DP / Média x 100.

Dessa forma, a partir da avaliação dos parâmetros de validação analisados, o método analítico demonstrou-se ser reprodutível com valores de coeficiente de variação (CV %) abaixo de 15% para todas as análises tanto do intraensaio como do interensaio, com exatidão dentro dos limites aceitáveis (BRASIL, 2003).

4.6.2 Quantificação de isoniazida em plasma de camundongos após administração de INH pela VO

Na figura 26 encontra-se o perfil de concentração plasmática em função do tempo obtida após a administração de INH pela VO em

camundongos na dose de 25 mg/Kg e na tabela 7 estão listados os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir deste experimento.

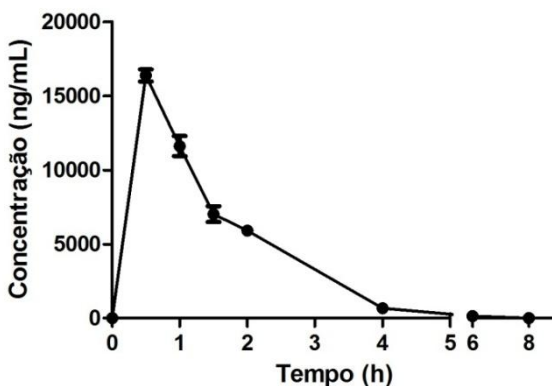


Figura 26: Curva de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de INH livre pela via oral na dose de 25 mg/Kg em camundongos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM para cada ponto (n= 4-5 animais por tempo de coleta).

Tabela 7. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de INH livre obtidos em camundongos após a administração pela via oral na dose de 25 mg/Kg.

Parâmetros	INH
C_{max} (ng/ml)	16.385 \pm 182
T_{max} (min)	30
AUC [0-inf] (ng/ min mL)	1.668.575 \pm 34017
t_{1/2 el} (min)	47
k_{el} (min ⁻¹)	0,015
Depuração (mL/min)	0,3
Vd (mL)	20

C_{max}: Concentração plasmática máxima; **T_{max}:** Tempo em que é atingido C_{max}; **AUC:** Área sob a curva de zero ao infinito; **t_{1/2 el}:** Tempo de meia-vida de eliminação; **k_{el}:** Constante de eliminação; **Vd:** Volume de distribuição. Resultados expressos como média \pm EPM (n= 4- 5 animais por tempo de coleta).

4.6.3 Quantificação de isoniazida em plasma de camundongos que receberam JVA pela VO

A figura 27 ilustra os resultados obtidos quanto à quantificação de JVA e INH nas mesmas amostras de plasma dos animais em que foram administrados JVA livre ou JVA encapsulado em micropartículas, ambos pela VO. Observa-se tanto na figura 27A como 27B que ocorre uma redução gradual da concentração plasmática de JVA com um consequente aumento da concentração de INH. A conversão de JVA a INH nos animais em que foram administradas as MPs de JVA inicia-se imediatamente após a administração e se mantém em concentrações acima de 1500 ng/mL por 2 hs. Somente no tempo de 30 min (Fig. 27C) a administração de MPs de JVA promoveu um aumento significativo na concentração de INH quando se comparou com a administração de JVA livre, sugerindo uma maior biotransformação do JVA neste tempo. De uma forma geral, a transformação de JVA a INH resulta em concentrações semelhantes independente se o JVA foi administrado na forma livre ou encapsulada em MPs. Porém com MPs JVA as concentrações de INH se mantêm mais uniforme no decurso temporal.

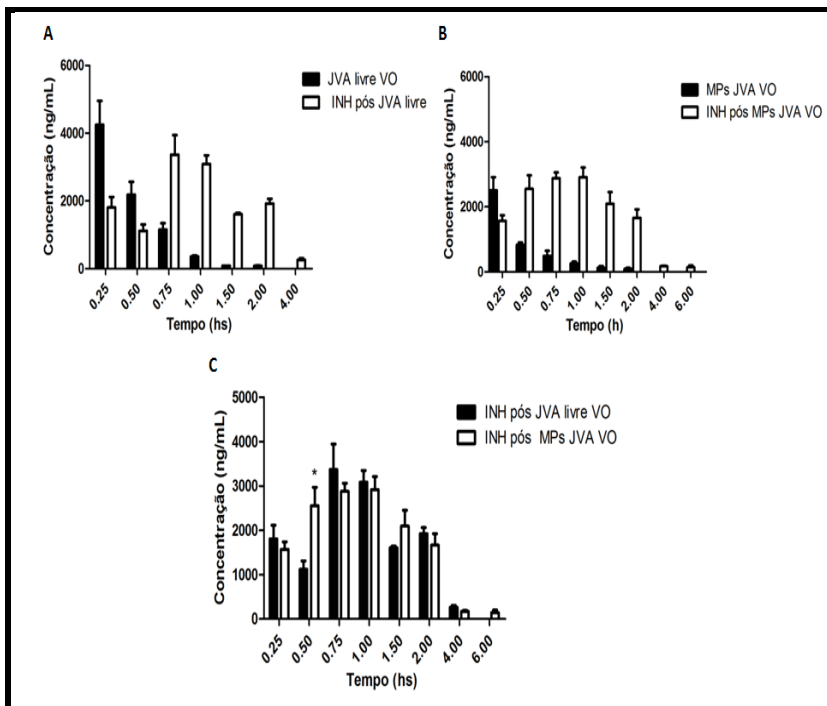


Figura 27: Perfis plasmáticos de JVA e INH obtidos após a administração de JVA livre e em MPs pela VO em camundongos na dose de 50 mg/Kg. (A) Administração de JVA livre; (B) Administração de MPs JVA; (C) Quantificação de INH a partir da administração de JVA livre e MPs pela VO. Resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = 4-5$ animais por tempo de coleta). *, indica diferença significativa entre as concentrações de INH obtidas após a administração de JVA livre e MPs.

As concentrações de INH obtidas com a administração de JVA e ilustradas na figura 27C foram confrontadas com as concentrações de INH quando doses equimolares de INH e JVA foram administradas por via oral em camundongos. A figura 28 apresenta os perfis plasmáticos em função do tempo obtidos após a administração de INH livre e a concentração de INH resultante da biotransformação de JVA quando administrado na forma livre (28A) ou em MPs (28B). Os perfis das curvas de concentração-tempo são bastante semelhantes, não havendo diferenças significativas na taxa de biotransformação do JVA a INH para a forma livre ou encapsulada. Na tabela 8, estão listados os

parâmetros farmacocinéticos que foram calculados para INH neste ensaio pela VO.

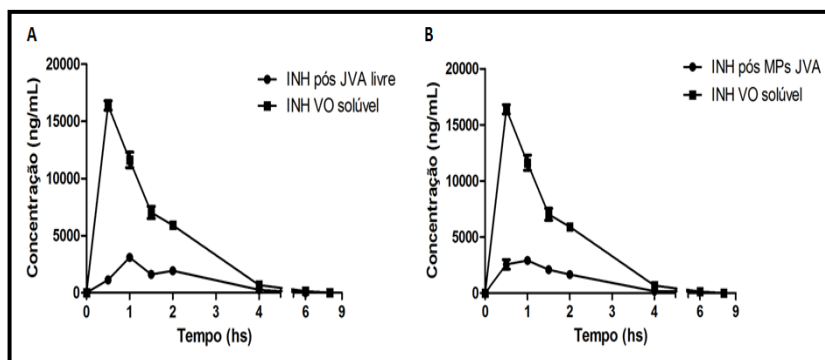


Figura 28: Curvas de concentração plasmática em função do tempo obtidas após administração de INH livre pela via oral na dose de 25mg/Kg e JVA livre (A) ou encapsulado em MPs (B) na dose de 50 mg/Kg. (A) INH pós JVA livre vs INH livre; (B) INH pós MPs JVA vs INH livre. Resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = 4-5$ animais por tempo de coleta).

Observando-se os dados farmacocinéticos listados na tabela 8, observa-se uma redução de C_{max} da INH (16.385 ng/mL) quando se compara a administração desta droga em relação ao C_{max} gerado a partir da administração de JVA (3.086 ng/mL e 2.915ng/mL) pela mesma via. O T_{max} obtido também foi modificado, sendo de 30 min para INH livre e de 60 min para a INH gerada após a administração de JVA livre ou em MPs. Os valores de AUC apresentaram-se bastante distintos, uma vez que a administração de INH livre gerou AUC de 1.668.575 ng/min.mL enquanto que a conversão de JVA a INH gerou valores entre 388.018 e 389.219 ng/min.mL a partir da administração de JVA livre e em MPs, respectivamente. Dividindo-se a AUC obtida a partir da administração de JVA pela AUC da INH livre obtém-se uma “biodisponibilidade relativa” de cerca de 25% ($F_R = 0,25$).

Os demais parâmetros calculados como a meia-vida de eliminação e a constante de eliminação para a INH não apresentaram diferenças significativas entre as formulações.

Tabela 8. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos de INH obtidos em camundongos após a administração de INH solúvel pela via oral na dose de 25 mg/Kg e de JVA livre e encapsulado em MPs na dose de 50mg/Kg.

Parâmetros	INH livre	INH pós JVA livre	INH pós MPs JVA
C_{max}	16.385 ±	3.086 ±	2.915 ± 79*
(ng/ml)	182	131*	
T_{max} (min)	30	60	60
AUC_[0-inf]	1.668.575 ±	388.018 ±	389.219 ±
(ng/ min mL)	34.016	13.106*	10.961*
t_{1/2 abs} (min)	7,9	n.c	n.c
t_{1/2 el} (min)	47	53	46
k_{el} (min ⁻¹)	0,015	0,013	0,015
Depuração	0,3	n.c	n.c
(mL/min)			
Vd (mL)	20	n.c	n.c

C_{max}: Concentração plasmática máxima; **T_{max}**: Tempo em que é atingido C_{max}; **AUC**: Área sob a curva de zero ao infinito; **t_{1/2 abs}**:Tempo de meia-vida de absorção; **t_{1/2 el}**: Tempo de meia-vida de eliminação; **k_{el}**: Constante de eliminação; **Vd**: Volume de distribuição; **n.c** –não calculado. Resultados expressos como média ± EPM (n = 4-5 animais por tempo de coleta). *, indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros analisados entre os grupos INH livre e INH pós JVA livre ou INH pós MPs JVA (Teste *t* Student).

De modo semelhante aos ensaios anteriores a figura 29 ilustra as curvas de concentrações plasmáticas de INH em função do tempo obtidas após a administração de JVA livre (Fig. 29A) e MPs JVA (Fig. 29B) pela via IP. Observa-se que a administração do composto livre produz concentrações plasmáticas de INH mais altas do que a administração da formulação microparticulada (MPs JVA), cuja conversão do JVA a INH é menor. O C_{max} de INH obtido a partir da administração de JVA livre foi de 2.066 ng/mL, enquanto que este valor

foi de 1.183 ng/mL para INH quando MPs de JVA foram administradas pela via IP.

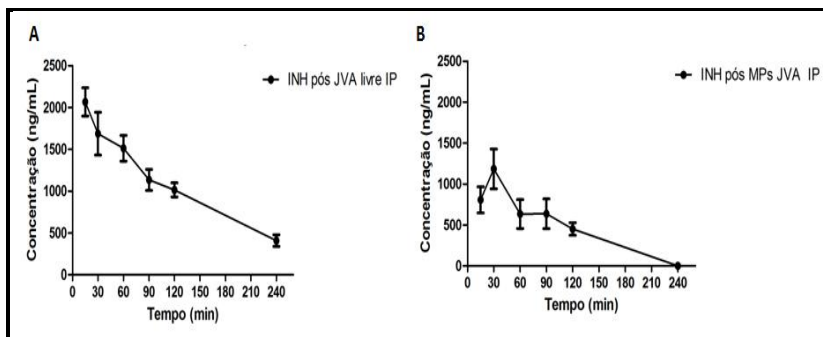


Figura 29: Concentração plasmática de INH após administração de JVA pela via IP. (A) Administração de JVA livre pela via IP. (B) Administração de MPs de JVA. Resultados foram expressos como média \pm EPM (n = 4-5 animais por tempo de coleta).

Comparando-se a administração de MPs de JVA pelas vias intraperitoneal e oral, observa-se que a conversão de JVA à INH pela via oral ocorre de maneira mais significativa. Observando-se a figura 30, percebe-se que a curva de concentração plasmática em função do tempo obtida a partir da administração das MPs pela VO apresenta um Cmax em torno de 2.914 ng/mL enquanto que o Cmax gerado a partir da via IP foi de 1.183 ng/mL. Além disso, a AUC calculada para as duas curvas foram de 389.219 ng/min.mL para via oral e de 130.441 ng/min.mL para via intraperitoneal, resultando em uma biodisponibilidade de INH cerca de 3 vezes maior para a administração das MPs pela via oral quando comparada a via IP.

No caso da administração de JVA livre pela via oral ou pela via intraperitoneal também se observa este mesmo perfil na conversão de JVA a INH, sendo que ocorre uma maior conversão à INH quando JVA foi administrado pela VO do que pela via IP (dados não mostrados).

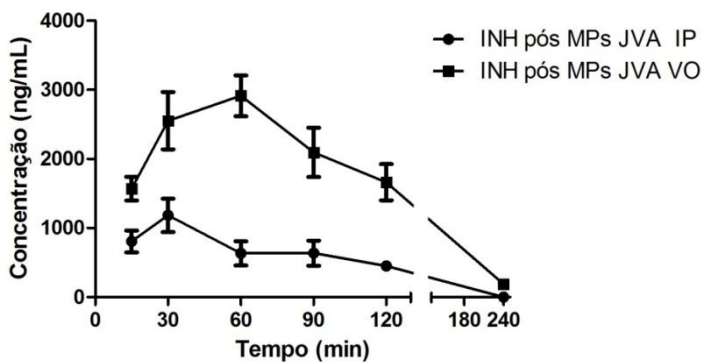


Figura 30: Curvas de concentração plasmática de INH em função do tempo obtidas após administração de MPs de JVA pelas vias IP e VO. Resultados foram expressos como média \pm EPM ($n = 4-5$ animais por tempo de coleta).

5. DISCUSSÃO

A tuberculose, doença infecciosa causada por um patógeno intracelular, o *Mycobacterium tuberculosis* apresenta-se como uma doença potencialmente curável em 95% dos casos em que a bactéria é sensível aos antimicrobianos (KOUL *et al.*, 2011). Apesar disso, é uma enfermidade com características diferenciadas em relação à maioria das infecções causadas por bactérias, principalmente em relação ao tempo da terapia, que é de no mínimo 6 meses de administrações diárias de múltiplos fármacos (BRASIL, 2010). Além do longo tempo de terapia, os efeitos adversos, a falha terapêutica observada em alguns casos e o desenvolvimento de resistência bacteriana ainda representam um desafio durante o tratamento contra o *Mtb*, que acometeu, somente em 2010 mais de 8 milhões de pessoas em todo o mundo (SOSNIK *et al.*, 2010; PANDEY e AHMAD, 2011; WHO, 2011).

A partir disso, sabe-se que é necessário o desenvolvimento de novas terapias com fármacos que preferencialmente sejam ativos contra cepas resistentes, encurtem o tempo de duração do tratamento, apresentem menos efeitos adversos e possam ser coadministrados com medicamentos antiretrovirais (SOSNIK *et al.*, 2010; KOUL *et al.*, 2011). Porém, considerando-se que a terapia antiTB apresenta-se efetiva na maioria dos casos, a utilização de novas tecnologias que possam melhorar a efetividade do tratamento alcançada através de um aporte de fármaco maior ao local da infecção, reduzindo os inconvenientes da terapia atual, também podem ser uma alternativa na a busca de novas abordagens para o tratamento da TB. Sistemas de liberação nano e microestruturados, formados a partir de diversos materiais tem sido estudados com objetivo de otimizar a terapia antiTB, superando as dificuldades encontradas atualmente (BLASI *et al.*, 2009; SOSNIK *et al.*, 2010; LAWLOR *et al.*, 2011; PANDEY e AHMAD, 2011; SHEGOKAR *et al.*, 2011).

A utilização de sistemas nanoestruturados no tratamento de doenças infecciosas apresenta-se como uma nova abordagem para a terapia com antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2010; TOTI *et al.*, 2011). Neste contexto, nosso grupo produziu nanopartículas poliméricas de PLGA encapsulando um análogo hidrofóbico da INH, denominado JVA e estas foram testadas quanto a sua efetividade antimicobacteriana em culturas de macrófagos infectados com cepa H37Rv de *Mtb*. Os resultados demonstraram que o tratamento *in vitro* de macrófagos infectados com NPs de JVA foi capaz de aumentar a morte bacteriana quando comparado ao JVA livre (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE

VECCHI *et al.*, 2012). A investigação mais detalhada de mecanismos que possam estar envolvidos nesse aumento da efetividade antimicobacteriana das NPs foram investigados e estudos buscando entender a interação dessas partículas com macrófagos e com o próprio bacilo foram realizados.

Uma das características que tornam o tratamento farmacológico para a TB complexo é o fato de ser causado por um patógeno intracelular. O tratamento de infecções causadas por patógenos intracelulares apresenta-se como um desafio, pois a localização do microorganismo dentro da célula do hospedeiro muitas vezes protege o patógeno da ação do sistema imunológico e de antimicrobianos com baixa penetração intracelular (BRIONES *et al.*, 2008). No caso da TB, a formação do granuloma pelas células do sistema imune também representa uma barreira para que os antimicrobianos alcancem o *Mtb* tanto àqueles contidos dentro dos macrófagos como no meio extracelular (GROSSET, 2003). Com o desenvolvimento destes sistemas coloidais buscam-se alternativas para aumentar o aporte de fármaco para o meio intra e extracelular resultando em um aumento da efetividade antimicobacteriana e redução no risco de desenvolvimento da resistência bacteriana (BRIONES *et al.*, 2008).

Resultados obtidos através de ensaios com macrófagos infectados com *Mycobacterium* demonstraram que as NPs poliméricas foram internalizadas pelas células e foram capazes de interagir diretamente com o bacilo dentro de macrófagos infectados por BCG-RFP (Fig. 8). Imagens de microscopia confocal confirmaram esta interação, observando-se uma colocalização entre o bacilo e as NPs dentro dos macrófagos. Apesar dos mecanismos exatos pelos quais NPs interagem diretamente com o bacilo no meio intracelular não terem sido investigados, é possível observar que nas células não infectadas as NPs encontram-se dispersas no citoplasma, diferente do que é observado quando as células estão infectadas, onde é evidente a colocalização entre o bacilo e as NPs.

Enquanto que micropartículas são naturalmente fagocitadas, a internalização das NPs ocorre por diferentes mecanismos e depende do seu tamanho, carga, composição e se há ou não a presença de ligantes na sua superfície. São necessários estudos com inibidores específicos para ser possível elucidar todos os mecanismos pelos quais diferentes NPs podem ser internalizadas pelas células (LAWLOR *et al.*, 2011). Alguns trabalhos sugerem que após a entrada das NPs nas células estas são mantidas em vesículas que podem se fundir com lisossomos presentes no citoplasma ou mesmo escaparem destas ficando livres no espaço

intracelular ocorrendo a liberação do seu conteúdo (PANYAM *et al.*, 2002; DIAZ-MOSCOSO *et al.*, 2010). Além disso, Panyam *et al.*, (2002) investigaram as possíveis vias de captura de NPs de PLGA com tamanho de 69 nm e potencial zeta de -12 mV e verificaram que a entrada dessas partículas em células musculares lisas (não fagocíticas) foi dependente de energia e ocorreu principalmente por endocitose via receptor de clatrina, além de que a inibição da polimerização de actina, por citocalasina D não afetou a captura das NPs. O conhecimento das vias de internalização das NPs pode ser uma estratégia interessante para ser possível modificar a superfície das NPs e ampliar ainda mais a entrada destas partículas nas células resultando em um aumento na concentração intracelular de fármacos.

Durante o desenvolvimento do granuloma, bacilos são encontrados no meio extra e intracelular, sendo que os que se encontram no meio extracelular estão em maior atividade metabólica e a eliminação destes no ambiente serve como fonte de contaminação e propagação da TB (GROSSET, 2003; NUERMBERGER e GROSSET, 2004). O desenvolvimento de sistemas de liberação que consigam aumentar o aporte de fármaco no granuloma, melhorar a penetração intracelular dos antimicrobianos através da parede bacteriana interagindo diretamente com o bacilo podem ser estratégias promissoras para o controle da doença e redução do risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, uma vez que a baixa penetração intracelular dos antibióticos está relacionada ao aumento no risco de resistência bacteriana e falha terapêutica (LAMBERT, 2002; NUERMBERGER e GROSSET, 2004; BUDHA *et al.*, 2008; KOUL *et al.*, 2011).

Além disso, a parede celular do *Mtb* se apresenta como a estrutura mais complexa dentro do grupo das bactérias gram-positivas. A presença de lipídios de alto peso molecular na sua superfície formam uma barreira de proteção, principal responsável pela dificuldade de penetração dos antimicrobianos. A penetração de antimicrobianos com característica mais hidrofílica é dificultada pela presença dessa barreira, sendo que fármacos como a rifampicina, que apresenta característica mais hidrofóbica tem maior facilidade de penetração. No caso de fármacos hidrofílicos como a INH, sugere-se que estes entrem através de canais de porinas, porém isto não está bem estabelecido (LAMBERT, 2002). A interação direta dos sistemas nanoestruturados com o bacilo poderia ser uma das alternativas para o aumento na penetração intracelular dos antimicrobianos. Neste sentido, estudos foram realizados e a interação direta das NPs com o bacilo foi evidenciada através de citometria de fluxo e as imagens de AFM confirmaram a

presença das NPs na superfície celular (Fig. 9). Além disso, observou-se que ocorre uma forte interação entre estes sistemas e os bacilos, pois mesmo após inúmeras lavagens, a detecção do íon JVA no grupo em que o bacilo foi incubado com NPs foi significativamente maior em relação à exposição ao JVA livre.

Estes resultados sugerem que NPs poliméricas de PLGA podem interagir com os bacilos no meio intra e extracelular, podendo promover um maior controle da doença pela maior capacidade de interação com as células e com as próprias bactérias. Além disso, foi demonstrado por De Faria, Roman, Souza, De Vecchi *et al.*, (2012) que estes sistemas realmente aumentaram a concentração intracelular de JVA quando NPs foram incubadas com macrófagos em comparação ao JVA livre. Outros estudos também evidenciaram o aumento na concentração intracelular de fármacos antiTB quando sistemas de liberação nano e microparticulados foram utilizados, tanto em culturas celulares como em experimentos *in vivo* (BARROW *et al.*, 1998; ANISIMOVA *et al.*, 2000; VERMA *et al.*, 2008)

Baseado nos resultados *in vitro* de eficácia antimicobacteriana obtidos com o JVA, principalmente quando este estava encapsulado em nanopartículas poliméricas de PLGA, estudos para a avaliação de sua eficácia antimicobacteriana *in vivo* se tornam necessários. Porém, no momento devido à falta de laboratório com nível de biossegurança BSL3, tornou-se inviável infectar animais com *Mtb* e realizar os ensaios de atividade antimicobacteriana deste análogo.

Então, seguindo o próximo objetivo, resolvemos investigar a farmacocinética deste composto administrado em camundongos pelas vias oral e intraperitoneal para avaliar o comportamento desta molécula *in vivo*. Atualmente, estudos farmacocinéticos estão envolvidos em todas as etapas no desenvolvimento de novos fármacos e a compreensão dos parâmetros farmacocinéticos de uma molécula é de extrema relevância para caracterizá-la e desta forma garantir o seu sucesso no desenvolvimento ou no caso de problemas com qualquer um desses parâmetros, otimizar a molécula ou mesmo eliminá-la (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

A farmacocinética estuda o movimento das substâncias pelo organismo, analisando os processos relacionados à sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção. Além disso, a compreensão e o conhecimento do perfil farmacocinético de uma molécula possibilita o estabelecimento da posologia adequada para a obtenção do efeito farmacológico desejado, ajustes de dose quando necessário com a

possibilidade de identificação de problemas relacionados à toxicidade em casos especiais (SILVA, 2006).

Para a realização dos ensaios farmacocinéticos foi necessário o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por CLAE para ser possível quantificar o analito de interesse em amostras de plasma. A validação da metodologia analítica é requerida para a realização de ensaios farmacocinéticos com o objetivo de garantir a confiabilidade dos dados gerados (BRASIL, 2003; SHAH *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento da metodologia, diferentes métodos de extração de amostras para plasma foram testados (extração líquido/líquido com acetato de etila, extração com diclorometano, precipitação de proteínas com acetonitrila) e o que melhor se adaptou as nossas condições experimentais foi a precipitação de proteínas com acetonitrila, seguida de evaporação do solvente e reconstituição em fase móvel. Além disso, testaram-se algumas substâncias como padrão interno durante o desenvolvimento do método, porém os resultados de linearidade das curvas obtidos após a correção das mesmas pelo padrão interno se mostraram menos satisfatórios. Desta forma, decidiu-se seguir com o desenvolvimento da metodologia sem a utilização do padrão interno, uma vez que foi possível alcançar uma boa linearidade do método sem a utilização do mesmo (dados não mostrados). A partir disso, efetuou-se a validação da metodologia analítica através de ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade, com avaliação da seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, cálculo dos limites de detecção e quantificação e estabilidade.

O método cromatográfico desenvolvido mostrou ser adequado para análise do JVA nas condições experimentais estabelecidas não sendo observados interferentes que afetassem a eluição do composto de interesse, ou seja, no tempo de retenção do analito. A linearidade das curvas de calibração foi obtida com concentrações que variaram entre 100 e 10.000 ng/mL com um coeficiente de correlação linear acima de 0,98 (BRASIL, 2003). Esta faixa de concentrações foi suficiente para analisar a maioria das amostras desconhecidas, que em caso de excederem a concentração mais alta da curva de calibração eram diluídas e corrigidas pelo fator de diluição.

Ensaios de repetibilidade (intraensaio) e reprodutibilidade (interensaio), em que foram avaliadas a precisão e exatidão do método foram considerados adequados, uma vez que o coeficiente de variação encontrado para todas as análises foi inferior a 15%, mesmo para as amostras próximas ao limite de quantificação, em que este valor pode ser de até 20% (BRASIL, 2003). As determinações da exatidão,

juntamente com a precisão determinam o erro analítico da metodologia e são os principais parâmetros avaliados durante os ensaios de validação (ROSING *et al.*, 2000).

A recuperação do método, que representa quanto do analito pode ser extraído das amostras de plasma após o preparo e análise por CLAE, foi em torno de 90% para todas as concentrações analisadas. Isto significa uma excelente recuperação quando se trata de extrações em matrizes complexas como é o caso do plasma. A sensibilidade do método calculada foi de 35 ng/mL e o limite de quantificação obtido foi de 106 ng/mL, sendo esses limites adequados para a realização das análises propostas para as concentrações mínimas esperadas nas amostras.

A análise da estabilidade do JVA realizada nos padrões analíticos indicou que o composto é estável frente à luz UV, congelamento/descongelamento e temperatura, porém quando amostras de plasma foram contaminadas com JVA, expostas ao congelamento/descongelamento e a temperatura observou-se uma diminuição significativa na recuperação do analito, indicando uma possível degradação do JVA sob as condições testadas. A identificação de problemas de estabilidade do analito no plasma foi de extrema importância para garantir que as amostras obtidas nos ensaios farmacocinéticos fossem processadas e analisadas sob condições adequadas, garantindo a exatidão e precisão dos resultados obtidos.

Assim, pode-se dizer que a metodologia desenvolvida e validada para análise de JVA em plasma de camundongos mostrou-se adequada para a sua aplicação nos nossos estudos farmacocinéticos, sendo de fácil execução, simples e rápida. Além disso, combina o uso de reagentes comumente utilizados para análises por cromatografia, detecção por ultravioleta, que apresenta poucas interferências, fase móvel com composição simplificada e método de extração rápido com o uso de pequenos volumes de amostra e baixo custo.

A partir disso, a metodologia foi aplicada para quantificação de JVA em plasma de animais que receberam este composto pelas vias oral e intraperitoneal. Observando-se as curvas de concentração plasmática em função do tempo (Fig. 14) obtidas após estes ensaios, observou-se um perfil plasmático semelhante para as duas curvas, porém com redução de cerca de 3 vezes na concentração plasmática máxima (C_{max}) quando se compara a via oral (4.249 ng/mL) com a via intraperitoneal (12.408 ng/mL). Da mesma forma, observa-se de maneira semelhante uma redução na $AUC_{[0-inf]}$ calculada para via oral (138.083

ng/min.mL) em relação a via IP (219.303 ng/min.mL), o que indica uma biodisponibilidade relativa (F_R) do JVA pela via oral de 63% ($F_R = 0,63$) quando comparado a via IP. Esta redução de cerca de 40% na biodisponibilidade pela VO pode ser atribuída a uma redução da absorção por esta via, ou mesmo degradação da molécula antes mesmo de ser absorvida, além de que a partir da administração pela via oral pode ocorrer metabolismo de primeira passagem no fígado, o que acaba reduzindo a biodisponibilidade da molécula.

Em relação à absorção do JVA neste ensaio, observa-se que o composto é absorvido muito rapidamente por ambas as vias, apesar de a meia-vida de absorção ($t_{1/2_{abs}}$) para a via oral (3,7 min), como esperado, ser maior do que o $t_{1/2_{abs}}$ para a via IP (1,7 min). Dentre as características físico-químicas de uma molécula, a sua solubilidade e a permeabilidade são as que tem maior influência na taxa de absorção. Outros importantes parâmetros são a lipofilicidade, carga (pKa) e a estabilidade no trato gastrointestinal (BUDHA *et al.*, 2008). Um dos parâmetros avaliados para definir a permeabilidade das substâncias, isto é, a sua capacidade de atravessar membranas biológicas é através da avaliação do coeficiente de partição óleo/água ($\log P$), que quanto maior o seu valor, mais hidrofóbica é a substância. A literatura relata que substâncias com $\log P$ entre 1 e 3 apresentam características de permeabilidade ideais, sendo absorvidos de forma passiva (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000). No caso do JVA, seu $\log P$ é de 3,2, então pode ser considerada uma molécula com alta permeabilidade (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012). Porém, como se trata de um composto com baixa solubilidade em água, a sua classificação baseada na classificação biofarmacêutica de drogas, o classifica como substância de classe II, que pode apresentar desta forma alguns problemas relacionados à absorção, porém isso não inviabiliza, necessariamente, a sua utilização pela via oral (BUDHA *et al.*, 2008).

Um dos parâmetros avaliados para indicar a distribuição de uma molécula pelo organismo é o volume de distribuição. No caso do JVA estes valores foram altos, porém semelhantes, quando administrado por ambas as vias (92 mL para a VO e 104 mL para a via IP). Como estes valores representam cerca de 5 vezes mais que o volume corporal de um camundongo concluímos que este valor de Vd é muito alto. Drogas com alto Vd se distribuem amplamente, pois apresentam alta afinidade pelos tecidos. As características de lipofilicidade e carga são os principais parâmetros que afetam a distribuição das drogas, geralmente moléculas não ionizadas em pH fisiológico e lipofílicas apresentam volumes de distribuição maiores (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000). Além disso, a

taxa de ligação a proteínas plasmáticas também afeta a distribuição das substâncias pelo organismo, sendo que substâncias com alta ligação a proteínas plasmáticas tendem a ficar na corrente circulatória (BUDHA *et al.*, 2008). No caso do JVA, como é uma molécula com alta lipofilicidade, se esperava que os valores encontrados para Vd fossem altos, demonstrando a sua alta permeabilidade através das membranas biológicas.

Além do Vd do JVA ser elevado, a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), calculada a partir da fase de decaimento terminal das concentrações plasmáticas da substância, foi bastante curta, com cerca de 14 minutos, o que indica uma rápida remoção deste composto do plasma. O tempo de meia-vida, juntamente com a depuração e a biodisponibilidade são os parâmetros considerados para a definição da posologia de uma molécula. No caso dos antimicobacterianos, preferem-se moléculas com $t_{1/2}$ mais longos para ser possível maiores intervalos entre as administrações, favorecendo o esquema posológico e a adesão dos pacientes ao tratamento (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000).

A taxa de depuração (Cl) calculada para o JVA foi de aproximadamente 4,8 mL/min, sendo este um valor considerado alto. A meia-vida curta é atribuída à alta taxa de depuração que faz com que a molécula seja rapidamente removida do plasma. O cálculo da depuração, neste trabalho, se refere à depuração total, pois indica tanto a depuração hepática, que inclui o metabolismo, como a depuração renal, geralmente responsável pela remoção das substâncias do organismo. Dessa forma, analisando-se os dados de redução da biodisponibilidade oral do JVA com os valores de depuração, pode-se sugerir que este composto tenha um alto metabolismo de primeira passagem, o que deve ser melhor investigado através da busca de metabólitos no plasma e também na urina.

Resumindo, estes resultados indicam que o JVA apresenta uma rápida absorção, com picos de concentração plasmática variando entre 10 e 15 minutos, dependendo da via de administração escolhida, com uma rápida distribuição pelo organismo (alto VD) e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) com menos de 15 minutos. Este perfil resulta em uma curta permanência do fármaco na circulação sistêmica, observando-se uma remoção desta molécula do plasma em aproximadamente 90 minutos.

A partir dos resultados farmacocinéticos observados com o JVA livre e da observação de que ocorreu um aumento da atividade antimicobacteriana do JVA quando encapsulado em NPs poliméricas de PLGA em cultura de macrófagos infectados por cepa de *Mtb* (DE

FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012) decidiu-se realizar um estudo farmacocinético preliminar com a administração de NPs poliméricas de PLGA contendo JVA pela via intraperitoneal.

A literatura mostra em alguns trabalhos que utilizaram nano e micropartículas poliméricas administradas por diferentes vias, de um modo geral, um prolongamento na meia-vida de antimicobacterianos, com aumento da biodisponibilidade e ajustes na posologia que permitiram um maior intervalo de dose sem comprometimento do efeito bactericida dos fármacos (DUTT e KHULLER, 2001a; AIN *et al.*, 2002; PANDEY, SHARMA, *et al.*, 2003; PANDEY, ZAHOR, *et al.*, 2003). Contudo, observando-se o perfil plasmático de JVA após administração IP de NPs, em nosso trabalho não foi possível verificar um prolongamento no tempo de permanência do JVA na circulação sistêmica, como esperado pelos resultados das publicações citadas, pois em nosso ensaio o JVA é removido do plasma em aproximadamente 120 minutos. Com isso, e com o objetivo de desenvolver sistemas de liberação para uma possível administração local, no nosso caso pulmonar, optou-se pela modificação do tamanho de partícula, produzindo-se desta forma micropartículas de PLGA para encapsular o JVA.

Antes da utilização das MPs contendo JVA nos ensaios farmacocinéticos foi necessária uma caracterização físico-química das MPs para se ter conhecimento do tipo de carreador que se estava trabalhando. Apesar da preparação das MPs ter sido feita a partir de metodologia descrita por (DUTT e KHULLER, 2001b), foi necessário um estudo de formulação prévio com o objetivo de otimizar a quantidade de JVA que poderia ser incorporado às formulações. Foi realizado um conjunto de análises para avaliar o teor de JVA, a eficiência de encapsulação (EE%) e a recuperação de JVA nas MPs. As análises cruzadas indicaram que a formulação produzida com 50 mg de JVA (relação fármaco polímero 1:2) apresentou uma EE% em torno de 80-90% com um teor de fármaco de aproximadamente 4.500 µg/mL, a qual foi a escolhida para dar sequência aos estudos.

A produção de MPs de JVA manteve alto o valor de eficiência de encapsulação quando comparado às NPs de JVA produzidas pelo nosso grupo, porém foi conseguido incorporar muito mais JVA a formulação em MPs do que nas NPs (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012). Isto representa uma vantagem, uma vez que menores volumes de partículas podem ser administrados nos animais para atingir a dose necessária. Além disso, a produção das MPs mostrou-se reprodutível, uma vez que formulações produzidas em dias

diferentes apresentaram valores de EE% e teor de JVA muito próximos, sem diferença estatística entre eles.

Apesar de a literatura relacionar o aumento da eficiência de encapsulação na medida em que aumenta a hidrofobicidade das moléculas em sistemas poliméricos (WISCHKE e SCHWENDEMAN, 2008; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010), os valores obtidos para as MPs poliméricas de JVA, cerca de 80% de EE, pela técnica utilizada mostraram-se muito superiores, por exemplo, aos valores obtidos por UL-AIN *et al.*, (2003) para a rifampicina (20-30%), que é o antimicobacteriano mais hidrofóbico utilizado no tratamento de primeira escolha para TB.

O tamanho médio das partículas obtidas tanto para MPs brancas como com JVA situou-se próximo a 2 µm de diâmetro. Partículas com estes diâmetros poderiam ser adequadas para uma possível administração pulmonar e, além disso, alguns trabalhos relatam que MPs de até 5 µm são capazes de atravessar a barreira intestinal (HODGES *et al.*, 1995; DAMGE *et al.*, 1996). No caso da via pulmonar, em geral, partículas maiores que 10 µm tendem a se acumular em áreas mais altas do trato respiratório apresentando redução nos efeitos terapêuticos desejados. Já partículas menores que 1 µm chegam às regiões alveolares, porém não se depositam com facilidade e são exaladas com a respiração. Partículas com tamanhos entre 1 e 5 µm apresentam-se com características favoráveis para passarem pelo trato respiratório alto e se depositarem na região inferior alveolar do trato respiratório, podendo apresentar um efeito terapêutico mais pronunciado (BAILEY e BERKLAND, 2009; MUTTIL *et al.*, 2009).

As fotomicrografias obtidas por MEV revelaram que as MPs apresentam-se com uma forma esférica e superfície lisa, o que está de acordo com dados da literatura, que mostram MPs de PLGA com estas características (WISCHKE e SCHWENDEMAN, 2008). Com a utilização desta técnica não foi possível verificar se havia diferenças morfológicas entre as MPs brancas e de JVA, observando-se somente partículas com tamanhos mais variados nas formulações que continham JVA.

Em síntese, a caracterização realizada nas MPs de JVA revelou uma EE% acima de 80%, com um alto teor de JVA associado as MPs e com um tamanho médio de partícula em torno de 2 µm. A análise morfológica evidenciou partículas esféricas com superfície lisa compatíveis com o aspecto de MPs poliméricas obtidas a partir de PLGA.

Com o objetivo de investigar a liberação do JVA a partir das MPs, estudos de liberação *in vitro* foram realizados em três meios de liberação que simulavam o fluido gástrico, o fluido intestinal e em tampão fosfato pH 7,4. Paralelamente ao estudo de liberação das MPs, o JVA livre também foi submetido a estas mesmas condições para verificar a sua estabilidade. Observou-se que o composto apresentou uma rápida degradação no fluido gástrico, sendo que após 4 h recuperou-se somente 25% da quantidade inicial de JVA adicionado a este meio. Já nos demais meios de liberação, este foi estável por até 24hs (Apêndice A).

A liberação obtida tanto no fluido intestinal como em PBS mostrou-se semelhante, observando-se uma liberação em torno de 70% na primeira meia hora, que chegou a cerca de 90% em 2hs e manteve-se assim até 24h. Alguns trabalhos também demonstraram uma rápida liberação de fármacos a partir de NPs, de PLGA observando-se a liberação de cerca de 80% de RIF em PBS em aproximadamente 15 minutos (SUNG *et al.*, 2009). Contudo, AIN *et al.*, (2002), observaram uma liberação de somente 20-30% de INH, RIF e PZA em pH alcalino a partir de MPs de PLGA por até 2 dias de análise, que se manteve abaixo desses valores por até 12 dias.

Entretanto, no fluido gástrico, apesar de levar em consideração a rápida degradação desta molécula no meio, no estudo de liberação em nenhum momento conseguiu-se verificar a liberação do JVA a partir das MPs. Resultados de ensaios de liberação a partir de MPs de PLGA de INH, RIF e PZA obtidos por AIN *et al.*, (2002) também demonstraram uma maior liberação no fluido intestinal e pouca liberação, em torno de 20%, no fluido gástrico, sendo esta situação atribuída aos diferentes mecanismos de liberação de moléculas a partir deste polímero nos diferentes meios, observando-se difusão e erosão em pH alcalino e somente difusão em pH ácido. Realizando uma análise mais criteriosa na superfície de partículas de PLGA expostas a um meio com pH 3,0, FREDENBERG *et al.*, (2011b) observaram o fechamento dos poros na superfície das partículas, devido às características físico-químicas do polímero, verificando uma redução drástica na liberação inicial de substâncias encapsuladas em micropartículas. Sabe-se que os dois principais mecanismos de liberação de moléculas a partir de nano e microestruturas de PLGA são a difusão e a degradação/erosão. Inicialmente, ocorre difusão de água para dentro da matriz que com o tempo culmina em erosão da partícula. A erosão do polímero é ocasionada pela degradação de fragmentos poliméricos solúveis em água, acompanhado por uma perda de peso progressiva da matriz e

liberação gradativa do fármaco através de difusão. As características físico-químicas do PLGA, tais como peso molecular, proporções de copolímeros e características de hidrofiliicidade são cruciais para o comportamento de degradação e a cinética de liberação de fármacos incorporados na matriz. Baixo peso molecular, baixa proporção entre ácidos lático/glicólico e características mais hidrofílicas tornam a liberação a partir da matriz polimérica mais rápida quando se compara com polímeros com alto peso molecular e características mais hidrofóbicas (FREDENBERG *et al.*, 2011a). Dessa forma, pode-se sugerir que a baixa liberação do JVA no fluido gástrico pode ter ocorrido devido às modificações estruturais na partícula em pH ácido, o que dificulta a liberação das moléculas por não permitir a difusão do meio para dentro da partícula e a saída das substâncias para o meio externo.

Quanto à atividade antimicobacteriana de MPs de JVA em cepas de *Mtb* H37Rv *in vitro* esta se mostrou dependente da dose, com um perfil similar entre o JVA livre e encapsulado em MPs (Fig. 23). Dados anteriores de nosso grupo revelaram que a atividade antimicobacteriana foi semelhante àquela obtida com nanopartículas de JVA, testada na mesma cepa de *Mtb* e nas mesmas condições experimentais (dados não mostrados). Assim, pode-se afirmar que o tamanho de partícula não comprometeu a atividade antimicobacteriana observada com o JVA, independente de este estar encapsulado em nano ou micropartículas poliméricas de PLGA.

A análise dos resultados do perfil farmacocinético do JVA livre administrado em camundongos pelas vias IP e VO revelaram que o composto apresenta uma rápida absorção, com um tempo de meia-vida de eliminação curto, com rápida remoção do plasma. Uma das características observadas com a utilização de sistemas coloidais e micropartículas é o aumento no tempo de permanência dos fármacos no organismo, possibilitando ajustes na posologia sem prejudicar a eficácia farmacológica (PANDEY e AHMAD, 2011; SHEGOKAR *et al.*, 2011; VRIGNAUD *et al.*, 2011). Buscando obter esse prolongamento no tempo de meia-vida do JVA e a melhora na sua biodisponibilidade, realizou-se a administração das MPs de JVA em camundongos pelas vias intraperitoneal e oral, uma vez que a administração de NPs com estes mesmos objetivos não se revelou promissora.

Apesar de um dos objetivos traçados ao se desenvolverem as MPs como sistema carreador era a administração pulmonar, esta não pôde ser explorada de maneira adequada, uma vez que não foi possível estabelecer uma cinética no plasma a partir da administração das MPs por esta via (dados não mostrados). Porém, experimentos de atividade

antimicobacteriana com esses carreadores podem ser realizados, pois o tratamento local com esses sistemas já mostrou vantagens no controle da TB e na redução de toxicidade dos fármacos, como relatados por estes autores (SUAREZ *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2005; GARCIA-CONTRERAS *et al.*, 2006). Diante das dificuldades surgidas para a avaliação da farmacocinética do JVA administrado por via pulmonar, optamos por dar prioridade aos ensaios com a administração por via intraperitoneal e oral para obtermos os perfis cinéticos de JVA a partir das MPs de JVA e compará-la com o JVA livre.

Observa-se nas figuras 24A e B que independente da via escolhida para a administração das MPs de JVA, este é rapidamente removido do plasma após a administração das MPs. Quando se compara a administração de JVA livre e encapsulado pela via IP (Fig. 24C), observa-se uma redução na biodisponibilidade de JVA quando este é administrado através das MPs. Porém, não é possível identificar se esta redução inicial na biodisponibilidade ocorre devido a uma liberação mais prolongada, pois após cerca de 1 h para via IP e 1,5 h para via oral não foi mais possível quantificar JVA no plasma dos animais tratados com MPs. Em relação à administração pela VO, observou-se um perfil semelhante à via IP.

Apesar de alguns trabalhos da literatura relatarem o prolongamento significativo na meia-vida e na AUC de antimicobacterianos administrados pela via oral em micropartículas poliméricas, promovendo redução de frequência de doses e vantagens terapêuticas (AIN *et al.*, 2002; UL-AIN *et al.*, 2003), nenhuma dessas situações puderam ser observadas em nosso trabalho com o JVA. Além disso, a redução da AUC observada nos grupos tratados com MPs de JVA indica uma redução na biodisponibilidade do JVA, possivelmente causada pela redução da liberação que diminuiu a taxa de absorção deste composto a partir das micropartículas de PLGA. Neste aspecto, vale lembrar que o ensaio *in vitro* de liberação do JVA microencapsulado ‘incubado’ no fluido gástrico simulado (FGS), simulando o pH estomacal, apresentou uma liberação bastante reduzida. A hipótese de que a exposição a meios ácidos pode danificar o arcabouço externo da micropartícula e bloquear a difusão do JVA do interior desta precisa ser melhor investigada. Todavia, esta situação pode elucidar em partes a observação de que ocorre uma redução da biodisponibilidade do JVA quando este foi administrado em MPs pela VO e comparado a via IP.

Por outro lado, as limitações da absorção podem estar relacionadas ao tamanho da partícula. DESAI *et al.*, (1997), demonstraram que a captura de partículas por células Caco-2 em cultura

dependia do seu tamanho, sendo que partículas de 1µm apresentaram uma eficiência de captação de somente 15%. Entretanto, outros autores relataram que partículas de 2 e até 5µm têm a capacidade de atravessar a barreira intestinal e serem absorvidas (HODGES *et al.*, 1995; DAMGE *et al.*, 1996). Contudo, estudos mais detalhados se fazem necessários em nosso modelo experimental para podermos descrever com mais clareza o que pode estar ocorrendo após a administração das MPs pela VO.

Com relação à via IP, TSAI *et al.*, (2007) observaram que a absorção para a circulação sistêmica de paclitaxel a partir de MPs com tamanho entre 2 e 4 µm foi mais lenta do que a observada a partir de NPs com tamanho de 600 nm, mantendo-se uma taxa de remoção da cavidade peritoneal mais lenta com um longo tempo de permanência do fármaco no peritônio. Em outro trabalho, em que foi administrado MPs de rifampicina (RIF) entre 1 e 10 µm foi observado que uma parte das MPs permaneceram aderidas a vários órgãos após 26 dias de tratamento, não sendo absorvidas para a circulação sistêmica, o que acabou prejudicando a eficácia do tratamento com este carreador por esta via (QUENELLE *et al.*, 1999). Desta maneira, pode-se sugerir que a redução na biodisponibilidade observada para o JVA a partir da administração das MPs pela via IP pode ter ocorrido devido a uma liberação mais lenta do composto a partir do carreador, ficando esta concentração plasmática abaixo do nível de detecção do método analítico utilizado para a quantificação do JVA em plasma.

A partir da observação de que o JVA é rapidamente removido do plasma, mesmo quando administrado em MPs, decidimos investigar se este poderia ser biotransformado a INH após a sua administração *in vivo*. Para isso, amostras de plasma obtidas dos estudos em que foram administrados JVA livre ou em MPs foram processadas e quantificadas por CLAE para doseamento de INH.

Como a metodologia analítica utilizada para quantificar INH já estava descrita na literatura, realizou-se uma validação parcial do método para padronização às nossas condições experimentais. O método apresentou-se linear na faixa de concentrações de 200 a 10.000 ng/mL, com um coeficiente de correlação linear acima de 0,98 (BRASIL, 2003). As análises de repetibilidade (intraensaio) e reprodutibilidade (interensaio), em que foi avaliada a precisão do método foram consideradas adequadas, uma vez que o coeficiente de variação encontrado para todas as análises foi inferior a 15%, mesmo para as amostras próximas ao limite de quantificação, em que este valor pode ser de até 20%. A análise de exatidão revelou valores dentro dos limites aceitáveis (BRASIL, 2003).

A recuperação do método, calculada pela relação entre as áreas obtidas dos padrões analíticos e as amostras extraídas do plasma ficou entre 60 e 66% para todas as concentrações analisadas, o que denota uma recuperação aceitável quando se trata de extrações em matrizes complexas como é o caso do plasma, desde que o método seja preciso e exato, como ficou demonstrado. Cabe salientar que os padrões analíticos de INH são extremamente estáveis em solução aquosa. Porém, quando em contato com o plasma apresentam uma degradação significativa quando armazenada em -20°C , observando-se uma redução de 15% em sua recuperação em apenas um dia, segundo estudos realizados por HUTCHINGS *et al.*, (1983). Em nossas condições experimentais observou-se uma perda de cerca de 50% em apenas um dia de armazenamento em -20°C (dados não mostrados), sendo extremamente necessário o rápido processamento das amostras após os ensaios *in vivo* com armazenamento em -80°C .

Inicialmente, realizamos a administração de INH livre pela VO, para obtermos o perfil farmacocinético em nossas condições experimentais. A literatura apresenta alguns valores bastante diversos para a farmacocinética da INH livre administrada em camundongos pela VO. A administração de INH na dose de 10 mg/Kg resultou em uma Cmax de aproximadamente 1,6 $\mu\text{g/mL}$, com Tmax de 2 hs e AUC de 10,25 $\mu\text{g/mL.h}$ (AHMAD *et al.*, 2006). Porém, outro trabalho realizado por AIN *et al.*, (2002), que administrou a mesma dose de INH sozinha ou associada à RIF e PZA observou um Cmax de 12,33 $\mu\text{g/mL}$ com um Tmax de 6 h, $t_{1/2}$ de 5,54 h e uma AUC de 47,88 $\mu\text{g/mL.h}$, para INH sozinha e quando combinada a RIF e PZA um Cmax de 10,22 $\mu\text{g/mL}$, com o mesmo Tmax, $t_{1/2} = 3,82$ h e uma AUC de 27,66 $\mu\text{g/mL.h}$. Da mesma forma, este autor, em outro trabalho com camundongos infectados obteve exatamente o mesmo perfil farmacocinético relatado anteriormente com um Cmax de 10,22 $\mu\text{g/mL}$, Tmax = 6 hs e AUC de 27,66 $\mu\text{g/mL.h}$ (UL-AIN *et al.*, 2003). Já ALMEIDA *et al.*, (2009), após a administração de uma dose de 25 mg/Kg de INH em camundongos, obtiveram um Cmax de 22 $\mu\text{g/mL}$ em 15 minutos, com uma AUC de 27,3 $\mu\text{g/mL.h}$, sendo que no tempo de 30 minutos a concentração plasmática obtida foi de 18 $\mu\text{g/mL}$ com um tempo de meia vida de eliminação de aproximadamente 60 minutos (observado através da curva de concentração plasmática em função do tempo).

Os nossos resultados estão bem próximos dos obtidos por ALMEIDA *et al.*, (2009), observando-se após a administração de 25 mg/Kg, uma concentração de cerca de 16 $\mu\text{g/mL}$ em 30 minutos, com

uma AUC em torno de 27,8 $\mu\text{g/mL.h}$ e tempo de meia-vida de 47 minutos. Porém, os demais parâmetros não estão disponíveis neste trabalho para comparação.

Sabe-se que a presença de alimentos modifica os parâmetros de C_{max} e AUC no caso da INH (LIN *et al.*, 2010), sendo que nestes trabalhos não estão descritos se os animais estavam ou não em jejum. No nosso trabalho, os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes da realização dos experimentos para evitar esse tipo de interferência nos resultados, uma vez que esse tipo de interação com a INH já é conhecida.

Em humanos, a INH após administração oral de uma dose de 5mg/Kg (300mg para adultos) é rapidamente absorvida, observando-se concentrações plasmáticas entre 3 e 5 $\mu\text{g/mL}$ dentro de 1-2 h. Sofre rápida distribuição, com baixa ligação a proteínas plasmáticas e seu metabolismo pela *N*-acetil transferase é determinado geneticamente. Nos acetiladores rápidos sua concentração plasmática é reduzida a cerca de 1/3 daquela observada nos acetiladores lentos, com meia-vida média de 1 e 3 h, respectivamente. A excreção de seus metabólitos e de uma pequena parte inalterada ocorre principalmente por via renal (Chambers, 2005). Observa-se desta forma, que a administração de 25mg/Kg em nosso experimento apresentou características de C_{max} mais altas do que geralmente são encontrados em humanos, porém com um tempo de meia-vida compatível com aquele observado em acetiladores rápidos.

A partir da determinação do perfil farmacocinético da INH pela VO obtido em nossas condições experimentais, amostras de plasma de animais que receberam JVA foram processadas para quantificação de INH. Observou-se, desta maneira, que independente da forma como o JVA foi administrado, na forma livre ou encapsulado em MPs e da via de administração escolhida, foi possível quantificar INH no plasma dos animais tratados com JVA.

Na figura 27 observa-se que ocorre uma rápida remoção do JVA do plasma, com aparecimento de INH já desde os primeiros 30 minutos após a administração de JVA livre ou encapsulado em MPs pela VO. De forma interessante, observa-se que apesar do JVA estar menos biodisponível quando administrado em MPs pela via oral, a quantidade de INH gerada a partir da administração de MPs ou do JVA livre (Fig. 27C) são muito semelhantes. Neste aspecto, parece-nos que a limitação na conversão de JVA em INH não tem a participação da formulação particulada. Além disso, a INH se mantém por mais tempo na

circulação, devido ao seu tempo de meia-vida, que foi de aproximadamente 50 minutos em nossas condições experimentais.

Quando as curvas obtidas a partir de INH livre são comparadas com aquelas obtidas a partir da conversão de JVA (Fig 28), observa-se um perfil semelhante entre elas, porém a INH livre apresenta um Cmax em torno de 16.000 ng/mL, enquanto que a conversão do JVA a INH resulta em um Cmax em torno de 3.000 ng/mL. Apesar desta redução em Cmax, o tempo de permanência da INH no plasma dos camundongos tratados com INH livre pela VO ou com JVA livre ou encapsulado foi de aproximadamente 4 h. Apesar de a INH apresentar um tempo de meia-vida em torno de 1 a 3 h em humanos, a sua administração é realizada somente uma vez ao dia, sem comprometimento da eficácia antimicobacteriana, uma vez que o seu MIC é extremamente baixo em torno de 0,02 e 0,05 µg/mL, porém suficiente para garantir a sua atividade antimicobacteriana *in vivo*.

ALMEIDA *et al.*, (2009), observaram que a administração de uma dose de 6,25 mg/Kg de INH em camundongos obteve um Cmax de 4 µg/mL e uma AUC de 4,9 µg/mL.h. Em nosso trabalho, a partir da administração de uma dose de JVA de 50 mg/Kg, pela VO tanto livre como em MPs, observamos um Cmax de 3 µg/mL com uma AUC de 6,5 µg/mL.h para INH. Essas concentrações plasmática de INH são muito próximas àquelas obtidas em humanos após a administração da dose padrão de INH de 5mg/Kg, onde observa-se um Cmax entre 2 e 3 µg/mL com uma AUC de 6,2 µg/mL.h para os acetiladores rápidos (PELOQUIN *et al.*, 1997).

Quando a via IP foi utilizada para administração de JVA livre ou encapsulado na dose de 50 mg/Kg, também foi possível a quantificação de INH no plasma dos animais tratados. Porém, diferentemente da VO, a conversão do JVA à INH a partir da administração das MPs foi cerca de metade daquela obtida com o JVA livre por esta mesma via. Ao compararmos a administração das MPs pela via oral e IP (Fig. 30), observa-se que a conversão à INH foi significativamente maior pela via oral, com uma biodisponibilidade relativa de somente 33% ($F_R = 0,33$) para a via IP.

Apesar de não ter sido investigada especificamente a maneira pela qual o JVA é convertido a INH, observou-se que em pH ácido ocorreu a transformação de uma pequena parte de JVA a INH (dados não mostrados), porém essa conversão foi pequena em relação a quantidade de JVA presente no meio. Entretanto, se observou que a biotransformação a INH *in vivo* chegou a cerca de 25% da dose

administrada de JVA, indicando que possivelmente essa conversão não é somente química, podendo existir outros mecanismos que promovam esta biotransformação. Como observamos que o JVA é capaz de ser biotransformado em INH e neste estudo comparativo ambos foram empregados em doses equimolares esperávamos uma taxa de conversão bem mais elevada. Isto sugere que o JVA pode ser biotransformado por diferentes caminhos em outros produtos além de INH. De fato, as enzimas que biotransformam as drogas estão presentes em muitos tecidos e fluidos corporais, de modo que uma droga pode ser biotransformada antes mesmo que seja absorvida. É bem reconhecido o papel dos microrganismos da microbiota intestinal nos processos de biotransformação de drogas, bem como das células da parede do trato digestório, especialmente do intestino delgado. Um exemplo desta participação explica a baixa biodisponibilidade para a ciclosporina, quando administrada por via oral (KOLARS *et al.*, 1991). Além disso, essa conversão foi mais significativa pela via oral do que pela via IP. Contudo, estudos mais detalhados devem ser realizados a fim de definir o exato mecanismo pelo qual o JVA é biotransformado em INH *in vivo*.

Dessa forma, o conjunto de resultados farmacocinéticos obtidos neste trabalho mostrou que o JVA, independente da forma como foi administrado, na forma livre ou encapsulado em MPs pela via oral ou IP, apresentou um perfil farmacocinético com características diferentes de seu precursor, a INH. Comparando-se o perfil do JVA com a INH, observou-se uma redução no tempo de meia-vida de forma significativa, com alto volume de distribuição e uma alta taxa de depuração plasmática. Essas características podem estar intimamente relacionadas ao aumento da hidrofobicidade da molécula, uma vez que a permeabilidade em tecidos está relacionada aos valores mais altos de *Log P*, favorecendo a sua passagem através das membranas biológicas (PANCHAGNULA e THOMAS, 2000; BUDHA *et al.*, 2008).

O aumento da permeabilidade do JVA associado ao fato de que esta molécula é biotransformada a INH pode representar uma vantagem, pois se pode obter um aumento do aporte tanto de JVA como de INH para os tecidos, uma vez que o JVA também pode ser convertido a INH nos próprios órgãos, aumentando a concentração do fármaco no local da infecção, obtendo-se uma melhora na atividade antimicobacteriana. Além disso, em estudos *in vitro*, o JVA apresentou a mesma atividade antimicobacteriana que a INH (DE FARIA, ROMAN, SOUZA, DE VECCHI *et al.*, 2012), reforçando o potencial desta molécula para a investigação de sua atividade em modelos *in vivo* de TB. Para confirmar esta hipótese será realizada a quantificação tanto de JVA como de INH

em alguns órgãos obtidos dos animais que foram submetidos ao tratamento com JVA livre e em MPs durante os estudos farmacocinéticos.

Além disso, a menor biodisponibilidade oral em relação à via IP, pode estar relacionada à redução da absorção ou ao metabolismo hepático de primeira passagem, uma vez que a taxa de depuração plasmática observada neste trabalho reflete a depuração hepática e renal. Contudo, estudos em busca de metabólitos devem ser realizados para tornar o estudo farmacocinético desta substância mais completo, elucidando possíveis vias de metabolização e excreção desta molécula.

A utilização de MPs poliméricas de PLGA pelas vias escolhidas não representou vantagens significativas no perfil farmacocinético do JVA. Todavia, diversos trabalhos utilizando modelos animais de TB já demonstraram o potencial desses carreadores para o tratamento local desta doença, através da administração de sistemas microestruturados pela via pulmonar. Desta maneira, estudos podem ser realizados por esta via para verificação da atividade antimicobacteriana de MPs de PLGA contendo JVA.

6. CONCLUSÕES

- Nanopartículas poliméricas de PLGA são capazes de interagir diretamente com a superfície do *Mycobacterium* e com o bacilo no meio intracelular de macrófagos infectados;
- A análise farmacocinética obtida após a administração de JVA livre pela via IP e oral indicou que este composto apresenta uma rápida absorção, com um tempo de meia-vida de eliminação curto, alto volume de distribuição e alta taxa de depuração plasmática. Desta forma, o JVA não apresentou o perfil esperado para um fármaco cuja pretensão seria o tratamento da tuberculose.
- A utilização de micropartículas poliméricas de PLGA contendo JVA administradas pelas vias oral e intraperitoneal não foram capazes de modificar de forma significativa os parâmetros farmacocinéticos do JVA livre;
- A administração de JVA em todas as formas e vias utilizadas permitiu que parte deste composto, fosse biotransformado em seu precursor, a INH, sendo que esta conversão foi mais acentuada após a administração de MPs pela via oral;

REFERÊNCIAS

ABADIE, V.; BADELL, E.; DOUILLARD, P.; ENSERGUEIX, D.; LEENEN, P. J.; TANGUY, M. et al. WINTER, N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1843-50, 2005.

AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, n. 5, p. 409-16, 2006.

AIN, Q.; SHARMA, S.; GARG, S. K.; KHULLER, G. K. Role of poly [DL-lactide-co-glycolide] in development of a sustained oral delivery system for antitubercular drug(s). **Int J Pharm**, v. 239, n. 1-2, p. 37-46, 2002.

ALMEIDA, D.; NUERMBERGER, E.; TASNEEN, R.; ROSENTHAL, I.; TYAGI, S.; WILLIAMS, K. et al. GROSSET, J. Paradoxical effect of isoniazid on the activity of rifampin-pyrazinamide combination in a mouse model of tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 10, p. 4178-84, 2009.

AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.

ANISIMOVA, Y. V.; GALPERINA, S. I.; PELOQUIN, C. A.; HEIFETS, L. B. Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 165-171, 2000.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; FENG, C. G.; LEIFER, C.; CHEEVER, A.; SHER, A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med**, v. 202, n. 12, p. 1715-24, 2005.

BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. **Med Res Rev**, v. 29, n. 1, p. 196-212, 2009.

BARICHELO, J. M.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K.; NAGAI, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 25, n. 4, p. 471-6, 1999.

BARNES, D. S. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. **Microbes Infect**, v. 2, n. 4, p. 431-40, 2000.

BARROW, E. L.; WINCHESTER, G. A.; STAAS, J. K.; QUENELLE, D. C.; BARROW, W. W. Use of microsphere technology for targeted delivery of rifampin to *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2682-9, 1998.

BARROW, W. W. Microsphere technology for chemotherapy of mycobacterial infections. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 26, p. 3275-84, 2004.

BLASI, P.; SCHOUBBEN, A.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; RICCI, M. Fighting tuberculosis: old drugs, new formulations. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 6, n. 9, p. 977-93, 2009.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 899 de 19 de maio de 2003.**, 2003. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm >. Acesso em: Fevereiro de 2012.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SAÚDE, S. D. V. E. Changes in tuberculosis treatment. **Rev Saude Publica**, v. 44, n. 1, p. 197-199, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, *Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil*, Brasília, DF, 2011.

BRIONES, E.; COLINO, C. I.; LANA O, J. M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **J Control Release**, v. 125, n. 3, p. 210-27, 2008.

BUDHA, N. R.; LEE, R. E.; MEIBOHM, B. Biopharmaceutics, pharmacokinetics and pharmacodynamics of antituberculosis drugs. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 8, p. 809-25, 2008.

BURRILL, J.; WILLIAMS, C. J.; BAIN, G.; CONDER, G.; HINE, A. L.; MISRA, R. R. Tuberculosis: a radiologic review. **Radiographics**, v. 27, n. 5, p. 1255-73, 2007.

CALLERI, E.; DE LORENZI, E.; FURLANETTO, S.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. **J Pharm Biomed Anal**, v. 29, n. 6, p. 1089-96, 2002.

CARD, J. W.; MAGNUSON, B. A. A review of the efficacy and safety of nanoparticle-based oral insulin delivery systems. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 301, n. 6, p. G956-67, 2011.

DAMGE, C.; APRAHAMIAN, M.; MARCHAIS, H.; BENOIT, J. P.; PINGET, M. Intestinal absorption of PLAGA microspheres in the rat. **J Anat**, v. 189 (Pt 3), p. 491-501, 1996.

DE FARIA, T. J.; ROMAN, M.; DE SOUZA, N. M.; DE VECCHI, R.; DE ASSIS, J. V.; DOS SANTOS, A. L. et al. BAFICA, A. An isoniazid analogue promotes nanoparticle-Mycobacterium tuberculosis interactions and enhances bacterial killing by macrophages. **Antimicrob Agents Chemother**, 2012.

DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; WALTER, E.; LEVY, R. J.; AMIDON, G. L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharm Res**, v. 14, n. 11, p. 1568-73, 1997.

DIAZ-MOSCOSO, A.; VERCAUTEREN, D.; REJMAN, J.; BENITO, J. M.; ORTIZ MELLET, C.; DE SMEDT, S. C.; FERNANDEZ, J. M. Insights in cellular uptake mechanisms of pDNA-polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (CDplexes). **J Control Release**, v. 143, n. 3, p. 318-25, 2010.

DORHOI, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 235-51, 2011.

DUTT, M.; KHULLER, G. K. Chemotherapy of Mycobacterium tuberculosis infections in mice with a combination of isoniazid and rifampicin entrapped in Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 6, p. 829-35, 2001a.

_____. Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. **Int J Antimicrob Agents**, v. 17, n. 2, p. 115-22, 2001b.

_____. Therapeutic efficacy of Poly(DL-lactide-Co-Glycolide)-encapsulated antitubercular drugs against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 363-6, 2001c.

DYE, C.; WILLIAMS, B. G. The population dynamics and control of tuberculosis. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 856-61, 2010.

EGEN, J. G.; ROTHFUCHS, A. G.; FENG, C. G.; WINTER, N.; SHER, A.; GERMAIN, R. N. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 271-84, 2008.

FESSI, H.; PUISIEUX F.; DEVISSAGUET J. P.; AMMOURY N.; BENITA S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.** v. 55; R1–R4, 1989.

FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSSON, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. **Int J Pharm**, v. 415, n. 1-2, p. 34-52, 2011a.

_____. Pore formation and pore closure in poly(D,L-lactide-co-glycolide) films. **J Control Release**, v. 150, n. 2, p. 142-9, 2011b.

GARCIA-CONTRERAS, L.; SETHURAMAN, V.; KAZANTSEVA, M.; GODFREY, V.; HICKEY, A. J. Evaluation of dosing regimen of respirable rifampicin biodegradable microspheres in the treatment of tuberculosis in the guinea pig. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 5, p. 980-6, 2006.

GOMBAR, V. K.; SILVER, I. S.; ZHAO, Z. Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability. **Curr Top Med Chem**, v. 3, n. 11, p. 1205-25, 2003.

GRIFFITHS, G.; NYSTROM, B.; SABLE, S. B.; KHULLER, G. K. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 827-34, 2010.

GROSSET, J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 833-6, 2003.

HEARN, M. J.; CYNAMON, M. H.; CHEN, M. F.; COPPINS, R.; DAVIS, J.; JOO-ON KANG, H. et al. WILSON, R. Preparation and antitubercular activities in vitro and in vivo of novel Schiff bases of isoniazid. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 10, p. 4169-78, 2009.

HODGES, G. M.; CARR, E. A.; HAZZARD, R. A.; CARR, K. E. Uptake and translocation of microparticles in small intestine. Morphology and quantification of particle distribution. **Dig Dis Sci**, v. 40, n. 5, p. 967-75, 1995.

HUTCHINGS, A.; MONIE, R. D.; SPRAGG, B.; ROUTLEDGE, P. A. A method to prevent the loss of isoniazid and acetylisoniazid in human plasma. **Br J Clin Pharmacol**, v. 15, n. 2, p. 263-6, 1983.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: methodology, Q2B, 2005.

JANIN, Y. L. Antituberculosis drugs: ten years of research. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 2479-513, 2007.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, 2001.

_____. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. **Ann Rheum Dis**, v. 61 Suppl 2, p. ii54-8, 2002.

KOLARS, J. C.; AWNI, W. M.; MERION, R. M.; WATKINS, P. B. First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. **Lancet**, v. 338, n. 8781, p. 1488-90, 1991.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 483-90, 2011.

KUMAR, A.; PATEL, G.; MENON, S. K. Fullerene isoniazid conjugate--a tuberculostat with increased lipophilicity: synthesis and evaluation of antimycobacterial activity. **Chem Biol Drug Des**, v. 73, n. 5, p. 553-7, 2009.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. **J Appl Microbiol**, v. 92 Suppl, p. 46S-54S, 2002.

LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation. **Macromol Biosci**, v. 7, n. 6, p. 767-83, 2007.

LAWLOR, C.; KELLY, C.; O'LEARY, S.; O'SULLIVAN, M. P.; GALLAGHER, P. J.; KEANE, J.; CRYAN, S. A. Cellular targeting and trafficking of drug delivery systems for the prevention and treatment of MTb. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 91, n. 1, p. 93-7, 2011.

LIN, M. Y.; LIN, S. J.; CHAN, L. C.; LU, Y. C. Impact of food and antacids on the pharmacokinetics of anti-tuberculosis drugs: systematic review and meta-analysis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 14, n. 7, p. 806-18, 2010.

MACCARI, R.; OTTANA, R.; VIGORITA, M. G. In vitro advanced antimycobacterial screening of isoniazid-related hydrazones, hydrazides and cyanoboranes: part 14. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, n. 10, p. 2509-13, 2005.

MADRAS., T. C. C. A concurrent comparison of isoniazid plus PAS with three regimens of isoniazid alone in the domiciliary treatment of pulmonary tuberculosis in South India. **Bull World Health Organ**, v. 23, p. 535-585, 1960.

MALLIPEDDI, R.; ROHAN, L. C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 533-47, 2010.

MITCHISON, D. A. The diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 171, n. 7, p. 699-706, 2005.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharm**, v. 385, n. 1-2, p. 113-42, 2010.

MSHANA, R. N.; TADESSE, G.; ABATE, G.; MIORNER, H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 5, p. 1214-9, 1998.

MUTTIL, P.; WANG, C.; HICKEY, A. J. Inhaled drug delivery for tuberculosis therapy. **Pharm Res**, v. 26, n. 11, p. 2401-16, 2009.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; MOLINA-SALINAS, G. M.; DUARTE-FAJARDO, Z. V.; VARGAS-VILLARREAL, J.; ESTRADA-SOTO, S.; GONZALEZ-SALAZAR, F. et al. SAID-FERNANDEZ, S. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 16, p. 5502-8, 2007.

NUERMBERGER, E.; GROSSET, J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 4, p. 243-55, 2004.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **Int J Pharm**, v. 201, n. 2, p. 131-50, 2000.

PANDEY, R.; AHMAD, Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. **Nanomedicine**, v. 7, n. 3, p. 259-72, 2011.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 4, p. 430-5, 2005.

PANDEY, R.; SHARMA, A.; ZAHOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K.; PRASAD, B. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 6, p. 981-6, 2003.

PANDEY, R.; ZAHOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 6, p. 373-8, 2003.

PANYAM, J.; ZHOU, W. Z.; PRABHA, S.; SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. **FASEB J**, v. 16, n. 10, p. 1217-26, 2002.

PELOQUIN, C. A.; JARESKO, G. S.; YONG, C. L.; KEUNG, A. C.; BULPITT, A. E.; JELLIFFE, R. W. Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 12, p. 2670-9, 1997.

QUENELLE, D. C.; STAAS, J. K.; WINCHESTER, G. A.; BARROW, E. L.; BARROW, W. W. Efficacy of microencapsulated rifampin in Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 5, p. 1144-51, 1999.

ROSING, H.; MAN, W. Y.; DOYLE, E.; BULT, A.; BEIJNEN, J. H. Bioanalytical liquid chromatographic method validation. A review of current practices and procedures. **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.**, v. 23, n. 3, p. 329-354, 2000.

RUSSELL, D. G.; BARRY, C. E., 3RD; FLYNN, J. L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. **Science**, v. 328, n. 5980, p. 852-6, 2010.

RUSSELL, D. G.; CARDONA, P. J.; KIM, M. J.; ALLAIN, S.; ALTARE, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 943-8, 2009.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. **PLoS Med**, v. 4, n. 5, p. e115, 2007.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J. et al. YACOBI, A. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. **Pharm Res**, v. 17, n. 12, p. 1551-7, 2000.

SHEGOKAR, R.; AL SHAAL, L.; MITRI, K. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. **J Pharm Pharm Sci**, v. 14, n. 1, p. 100-16, 2011.

SNIDER, D. E., JR.; COHN, D. L.; DAVIDSON, P. T.; HERSHFELD, E. S.; SMITH, M. H.; SUTTON, F. D., JR. Standard therapy for tuberculosis 1985. **Chest**, v. 87, n. 2 Suppl, p. 117S-124S, 1985.

SOSNIK, A.; CARCABOSO, A. M.; GLISONI, R. J.; MORETTON, M. A.; CHIAPPETTA, D. A. New old challenges in tuberculosis: potentially effective nanotechnologies in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 4-5, p. 547-59, 2010.

SUAREZ, S.; O'HARA, P.; KAZANTSEVA, M.; NEWCOMER, C. E.; HOPFER, R.; MCMURRAY, D. N.; HICKEY, A. J. Airways delivery of rifampicin microparticles for the treatment of tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, n. 3, p. 431-4, 2001.

SUNG, J. C.; PADILLA, D. J.; GARCIA-CONTRERAS, L.; VERBERKMOES, J. L.; DURBIN, D.; PELOQUIN, C. A. et al. EDWARDS, D. A. Formulation and pharmacokinetics of self-assembled rifampicin nanoparticle systems for pulmonary delivery. **Pharm Res**, v. 26, n. 8, p. 1847-55, 2009.

THIERRY, B. Drug nanocarriers and functional nanoparticles: applications in cancer therapy. **Curr Drug Deliv**, v. 6, n. 4, p. 391-403, 2009.

TOTI, U. S.; GURU, B. R.; HALI, M.; MCPHARLIN, C. M.; WYKES, S. M.; PANYAM, J.; WHITTUM-HUDSON, J. A. Targeted delivery of antibiotics to intracellular chlamydial infections using PLGA nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 27, p. 6606-13, 2011.

TSAI, M.; LU, Z.; WANG, J.; YEH, T. K.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. Effects of carrier on disposition and antitumor activity of intraperitoneal Paclitaxel. **Pharm Res**, v. 24, n. 9, p. 1691-701, 2007.

UL-AIN, Q.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Chemotherapeutic potential of orally administered poly(lactide-co-glycolide) microparticles containing isoniazid, rifampin, and pyrazinamide against experimental tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 9, p. 3005-7, 2003.

USP 32 – *Farmacopéia Americana*, 32ª edição, 2009.

VERMA, R. K.; KAUR, J.; KUMAR, K.; YADAV, A. B.; MISRA, A. Intracellular time course, pharmacokinetics, and biodistribution of isoniazid and rifabutin following pulmonary delivery of inhalable microparticles to mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3195-201, 2008.

VILCHEZE, C.; JACOBS, W. R., JR. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. **Annu Rev Microbiol**, v. 61, p. 35-50, 2007.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593-604, 2011.

WHO. **Implementing the Stop TB Strategy: a handbook for national tuberculosis control programmes.**, 2008. Disponível em:<http://www.who.int/tb/publications/2008/who_tbm_tb_2008_401_eng.pdf>. Acesso em: Abril, 2010.

_____. **Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report**, Geneva, Suíça, 2009. Disponível em:<http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/en/index.html>. Acesso em: Abril, 2010.

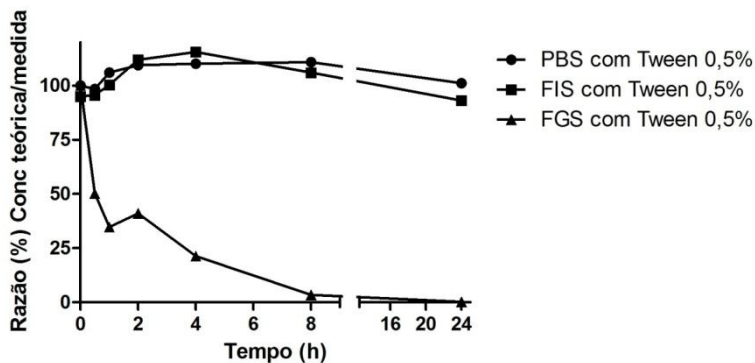
_____. **Global tuberculosis control: WHO report 2011**, Geneva, Suíça, 2011. Disponível em:<http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: Fevereiro de 2012.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **Int J Pharm**, v. 364, n. 2, p. 298-327, 2008.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKU, D.; HU, C. M.; HUANG, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 6, p. 585-94, 2010.

ZHOU, H.; ZHANG, Y.; BIGGS, D. L.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W.; CHRISTIANS, U. et al. NG, K. Y. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages. **J Control Release**, v. 107, n. 2, p. 288-99, 2005.

APÊNDICE A – ESTABILIDADE DE JVA LIVRE NOS MEIO DE DISSOLUÇÃO UTILIZADOS NO ESTUDO DE LIBERAÇÃO DAS MPs POLIMÉRICAS DE PLGA



Apêndice A: Estabilidade do JVA livre nos meios de dissolução utilizados no estudo de liberação das MPs polimérica de PLGA. Percebe-se que no FGS a molécula sofre decomposição, observando-se uma recuperação de somente cerca de 30% já na primeira hora após o contato com o meio de dissolução e em 8hs não é possível quantificar o composto no FGS. Nos demais meios, o composto apresenta-se estável até 24hs.

ANEXO 1 – Protocolo de Pesquisa aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**Protocolo**

PP00517

Título

Estudo farmacocinético de um análogo de isoniazida (JVA 001) encapsulado em sistemas nanoparticulados de ácido poli-lático-co-glicólico administrados em camundongos

Data de Entrada

20/08/2010

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

05/11/2010

Considerações

Ofício nº 216/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Anicleto Poli, Departamento de Farmacologia – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de quinhentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e Biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.027323/2010-83

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 10/02/2013

Data 10/11/2010

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE